

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ANDRESE ALINE GASPARIN

AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES PRÉ-
MENOPÁUSICAS PORTADORAS DE LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO

Porto Alegre, dezembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

ANDRESE ALINE GASPARIN

AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES PRÉ-
MENOPÁUSICAS PORTADORAS DE LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas,
UFRGS, como requisito para obtenção do título
de Mestre

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Tavares
Brenol

Porto Alegre, dezembro de 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Gasparin, Andrese Aline
AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES PRÉ-
MENOPÁUSICAS PORTADORAS DE LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO / Andrese Aline Gasparin. -- 2014.
70 f.

Orientador: João Carlos Tavares Brenol.
Coorientador: Odirlei André Monticielo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2014.

1. Lupus eritematoso sistêmico. 2. Reserva
ovariana. 3. Hormônio anti-Mülleriano. I. Brenol, João
Carlos Tavares, orient. II. Monticielo, Odirlei
André, coorient. III. Título.

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Valdemar e Inês Gasparin e ao meu amor Arthur B. Trotta.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Carlos Tavares Brenol por me ensinar a exercer com paixão a medicina e ser estímulo constante de crescimento e qualificação.

Ao Prof. Dr. Odirlei André Monticielo, pela presença constante e prontidão a oferecer apoio sempre que necessitei.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, chefe do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por proporcionar um ambiente de trabalho agradável e favorável ao desenvolvimento acadêmico e crescimento intelectual de seus integrantes.

Aos meus colegas médicos contratados Rafael Mendonça da Silva Chakr, Penélope Esther Palominos e Nicole Pamplona Bueno de Andrade pela parceria incondicional no trabalho e pela amizade sincera.

Aos professores Charles Lubianca Kohem, Claiton Viegas Brenol e Sandra Helena Machado por terem feito parte da minha formação como médica reumatologista, transmitindo seus conhecimentos com carinho e dedicação.

Aos meus colegas de residência Pedro Guilherme Schneider, Rafael Dreves Tesche, Daniela Viecceli, Nizele Aparecida Nilson Calegari da Silva e Nicole Pamplona Bueno de Andrade por seu companheirismo durante este período difícil, mas que sempre renderá ótimas recordações.

Às médicas residentes da reumatologia Vanessa Hax, Ana Laura Didonet Moro, Carolina Tesche, Carla Forgiarini Saldanha e Alessandra Kisner pelo trabalho e aprendizado de cada dia.

À Carolina Irulegui Rodrigues e Anderson Lacerda pelo companheirismo nos tempos de trabalho na pesquisa no CPC.

Às secretárias do Serviço de Reumatologia Sibeli Machado Garcia e Daiane Olsson de Souza pelo apoio e paciência. Presto meu agradecimento, de forma geral,

aos funcionários do ambulatório de Lúpus Eritematoso Sistêmico da zona 15, com carinho especial à Lorena Koglin, alunos de iniciação científica, em especial Jordana Vaz Hendler e Lucian Souza e todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“O saber humano se espalha para todos os lados, a perder de vista, de modo que nenhum indivíduo pode saber sequer a milésima parte daquilo que é digno de ser sabido.”

Arthur Schopenhauer

Resumo

Objetivos: A reserva ovariana de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) pode ser afetada pela atividade de doença e pelo tratamento medicamentoso. Estudos realizados até o momento mostram que pacientes com LES têm taxas de fertilidade semelhantes às de mulheres híginas da mesma idade. Este trabalho tem como objetivo estudar a reserva ovariana de pacientes com LES e compará-la com a de controles saudáveis através da dosagem do hormônio anti-Mülleriano (HAM).

Métodos: Estudo de caso-controle no qual foram incluídas 80 mulheres pré-menopáusicas, sendo 40 pacientes com diagnóstico de LES segundo critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1997 e 40 controles híginos pareados pelo uso de anticoncepcional oral. Foi utilizado o kit Human AMH ELISA (CUSABIO, Wuhan, China) para a determinação quantitativa da concentração sérica do HAM em sangue venoso.

Resultados: Não houve diferença significativa entre os níveis séricos de HAM nas pacientes com LES e nos controles ($22,79 \pm 17,32$ ng/ml versus $21,41 \pm 16,22$ ng/ml, respectivamente; $p=0,7$), mesmo após ajuste para a idade ($21,03 \pm 2,74$ ng/ml versus $23,97 \pm 2,71$ ng/ml; $p=0,5$). Não foi identificada correlação do HAM com tempo de doença ($r=0,2$; $p=0,3$), índice de massa corporal (IMC) ($r=0,2$; $p=0,2$) e índices de atividade [SLEDAI ($r=0,1$; $p=0,7$)] e cronicidade de doença [SLICC ($r=0,1$; $p=0,7$)]. Não houve associação do HAM com etnicidade, tabagismo ativo e uso prévio de ciclofosfamida ou outros imunossupressores.

Conclusão: Neste estudo transversal, mulheres com LES apresentaram níveis de HAM semelhantes aos de controles saudáveis, indicando reserva ovariana preservada nessa população.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico, hormônio anti-Mülleriano, reserva ovariana.

Abstract

Objective: The ovarian reserve of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) may be affected by disease activity and medication use. Studies have found that patients with SLE have similar fertility rates to healthy women of the same age. The goal of the present study was to investigate the ovarian reserve of patients with SLE by measuring anti-Müllerian hormone (AMH) levels, and compare it to that of healthy controls.

Method: This was a case-control study performed on 80 premenopausal women, of whom 40 fulfilled the 1997 *American College of Rheumatology (ACR)* criteria for SLE and 40 healthy controls paired by hormonal contraceptive use. Serum concentrations of AMH in peripheral venous blood were measured using a Human AMH ELISA kit (CUSABIO, Wuhan, China).

Results: AMH serum levels did not differ between patients with SLE and controls (22.79 ± 17.32 ng/ml versus 21.41 ± 16.22 ng/ml, respectively, $p=0.7$), even after adjusting for age (21.03 ± 2.074 ng/ml versus 23.97 ± 2.71 ng/ml; $p=0.5$). AMH levels were not significantly correlated with disease duration ($r=0.2$; $p=0.3$), body mass index (BMI) ($r=0.2$; $p=0.2$) and disease activity [SLEDAI ($r=0.1$; $p=0.7$)] and damage indices [SLICC ($r=0.1$; $p=0.7$)]. No associations were found between AMH and ethnicity, current smoking, as well as current or prior use of cyclophosphamide and other immunosuppressants.

Conclusion: In this cross-sectional study, women with SLE demonstrated similar AMH levels to healthy controls, suggesting preserved ovarian reserve in this population.

Keywords: Systemic lupus erythematosus, anti-Müllerian hormone, ovarian reserve.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo dos principais artigos publicados avaliando a reserva ovariana através do HAM em pacientes com LES.....	31
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Fases do desenvolvimento da autoimunidade patogênica.....	17
Figura 2. Variação do nível sérico do HAM ao longo da vida.....	24
Figura 3. Hormônio anti-Mülleriano e foliculogênese.....	25

Lista de Abreviaturas

ACR	<i>American College of Rheumatology</i> (Colégio Americano de Reumatologia)
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
BAFF	Fator de ativação de linfócitos B
BLyS	Estimulador de linfócitos B
CFA	Contagem de folículos antrais
CYC	Ciclofosfamida
D	Diâmetro
DHEA	Deidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Epstein-Barr vírus
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAN	Fator antinuclear
FOP	Falência ovariana prematura
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos
HAM	Hormônio anti-Mülleriano
HLA	Antígeno leucocitário humano
IL-1	Interleucina 1
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LFA-1	Antígeno 1 associado à função do linfócito
MTX	Metotrexato
NK	<i>Natural Killer</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SAAF	Síndrome anticorpo antifosfolípide
SLEDAI	<i>Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
SnRNPs	Pequenas partículas ribonucleicas nucleares

SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TGF β	Fator transformador do crescimento beta
Th2	T <i>helper</i> 2
TLR-7	<i>Toll-like receptor</i> 7
TLR-9	<i>Toll-like receptor</i> 9
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREX1	Exonuclease de reparo 3'-5' 1
UV	Radiação ultravioleta

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
	2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	15
	2.2 Epidemiologia.....	15
	2.2.1 <i>Lúpus eritematoso sistêmico</i>	15
	2.2.2 <i>Infertilidade</i>	15
	2.2.3 <i>Infertilidade nas pacientes com lúpus eritematoso sistêmico</i>	16
	2.3 Diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico.....	16
	2.4 Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico.....	16
	2.4.1 <i>Predisposição genética</i>	17
	2.4.2 <i>Fatores hormonais</i>	18
	2.4.3 <i>Fatores imunológicos</i>	18
	2.4.4 <i>Fatores ambientais</i>	20
	2.5 Tratamento do lúpus eritematoso sistêmico e seu impacto na fertilidade.....	21
	2.6 A influência do lúpus eritematoso sistêmico na fertilidade.....	21
	2.7 O hormônio anti-Mülleriano como marcador da reserva ovariana.....	22
	2.8 Avaliação da reserva ovariana em pacientes lúpicas pré-menopáusicas através do hormônio anti-Mülleriano.....	29
3	OBJETIVOS.....	32
	3.1 Objetivo principal.....	32
	3.2. Objetivos secundários.....	32

4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	33
5	ARTIGO EM INGLÊS.....	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
7	ANEXOS.....	53

1 Introdução

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica, heterogênea, de etiologia ainda não completamente conhecida, que tem como característica a produção de autoanticorpos e o acometimento de múltiplos sistemas orgânicos (1). Atinge predominantemente mulheres em idade reprodutiva e pode afetar sua fertilidade pela atividade da doença, bem como pelos tratamentos utilizados no seu manejo (2). A infertilidade é definida pela falha em conceber após 12 meses de intercurso sexual regular desprotegido (3).

O termo “reserva ovariana” refere-se ao potencial reprodutivo em função do número e da qualidade dos ovócitos remanescentes, sendo, portanto, um preditor de fertilidade (4). A reserva ovariana total é composta pelos folículos primordiais em repouso e pelos folículos que entram em crescimento após o recrutamento. O hormônio anti-Mülleriano (HAM) é uma glicoproteína dimérica, membro da superfamília do fator transformador do crescimento beta (TGF β). No ovário, é secretado apenas pelas células da granulosa dos folículos ovarianos em crescimento e seu nível sérico tem se mostrado marcador fidedigno da reserva ovariana (5).

A taxa de sobrevivência em 5 anos em pacientes portadores de LES aumentou de cerca de 40% nos anos 50 para mais de 90% em estudos que iniciaram após 1980 (6,7) e a tendência é de que este aumento continue no século XXI (8). Apesar da redução do risco de mortalidade precoce, os pacientes ainda encontram-se sob significativo risco de morbidade causado pela atividade da doença e pelos efeitos adversos do tratamento, principalmente corticoides e agentes citotóxicos (9). Sendo assim, ainda existe influência significativa na saúde reprodutiva de mulheres jovens e no seu planejamento familiar.

As pacientes que apresentam reserva ovariana diminuída têm maior risco de infertilidade, Identificar estas pacientes mostra-se útil na medida em que permite

evitar tratamentos de maior toxicidade ovariana e buscar alternativas para preservar a função reprodutiva destas pacientes.

2 Revisão da literatura

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Na revisão da literatura, pretende-se abordar as possíveis influências do LES em relação à fertilidade feminina e explorar o valor do HAM como instrumento adequado na avaliação da reserva ovariana tanto em mulheres híginas quanto em pacientes com LES. A estratégia de busca incluiu a base de dados MEDLINE (PubMed). Foi realizada revisão das referências bibliográficas dos artigos citados no intuito de incluir possíveis artigos faltantes na primeira estratégia de busca. Também foram consultados livros-textos. Os termos utilizados no site PubMed em busca realizada em janeiro de 2012 foram “systemic lupus erythematosus”, “anti-mullerian hormone and ovarian reserve” e “systemic lupus erythematosus and anti-mullerian hormone”. Foram localizados 57.428 artigos com os termos “systemic lupus erythematosus”; 471 artigos com os termos “anti-mullerian hormone and ovarian reserve” e apenas 14 artigos com os termos “systemic lupus erythematosus and anti-mullerian hormone”.

2.2 Epidemiologia

2.2.1 *Lúpus eritematoso sistêmico*

A incidência anual de LES nos Estados Unidos varia entre de 1,8 a 7,6 casos/100.000 pessoas por ano (10,11). Estudo brasileiro realizado em Natal (RN) em 2000 encontrou taxa de incidência de 8,7 por 100.000/ano, sendo 14,1 para mulheres e 2,2 para homens (12). A prevalência global do LES nos Estados Unidos e Hawaii tem sido reportada variando entre 14,6 e 122 casos/100.000 pessoas (10,11,13). Em mulheres, as taxas de prevalência variam de 164 (caucasianas) a 406 (afroamericanas) por 100.000 (14).

2.2.2 *Infertilidade*

Infertilidade é definida como falha em conceber após um período de 12 meses de intercurso sexual regular desprotegido.

Estudos prospectivos realizados nos Estados Unidos encontraram incidência estimada de infertilidade em mulheres de cerca de 12 a 18% (15). A frequência de infertilidade primária em mulheres casadas por grupo etário nos Estados Unidos entre 1982 e 2010 foi de 7,3 a 9,1% para mulheres com idade entre 15 a 34 anos, de 25% entre 35 a 39 anos e de 30% entre 40 a 44 anos (16).

2.2.3 Infertilidade nas pacientes com lúpus eritematoso sistêmico

Infertilidade é definida como falha em conceber após um período de 12 meses de intercurso sexual regular desprotegido.

Mulheres com LES têm número de gestações similar a mulheres híidas, porém com maiores taxas de perdas gestacionais, sobretudo causadas pela síndrome do anticorpo antifosfolípide (SAAF) (17,18).

2.3 Diagnóstico de lúpus eritematoso sistêmico

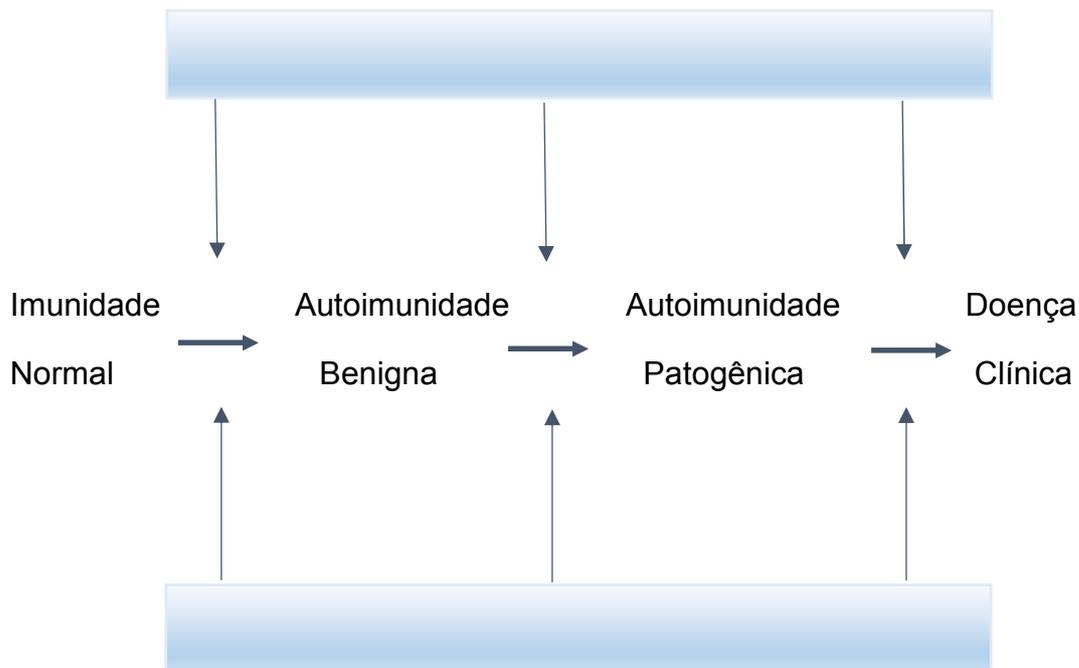
A heterogeneidade clínica e a falta de características patognomônicas tornam o diagnóstico de LES um desafio. A exclusão de diagnósticos diferenciais é um passo importante no processo diagnóstico. Os critérios de classificação devem ser usados como guias para ajudar a identificar algumas características relevantes da doença, lembrando que eles foram criados com o objetivo de classificar pacientes para padronização da linguagem científica em estudos clínicos. História clínica detalhada e exame físico completo são fundamentais, devendo os exames de laboratório serem complementares a esta investigação. Alguns marcadores sorológicos como o anti-DNA dupla hélice e anti-Smith (Sm) são importantes pois têm alta especificidade (19).

Podemos dizer que o paciente tem LES quando preenche pelo menos 4 de 11 critérios de classificação do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1982, revisados em 1997 (Anexo 1).

2.4 Patogênese do lúpus eritematoso sistêmico

A etiologia do LES é pouco conhecida e claramente multifatorial. Muitas observações sugerem papel de fatores genéticos, hormonais, imunológicos e ambientais. A figura 1 mostra as fases do desenvolvimento da autoimunidade patogênica.

Figura 1 – Fases do desenvolvimento da autoimunidade patogênica



Adaptado de Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 2003;349(16):1526-33.

2.4.1 Predisposição genética

Agregação familiar, altas taxas de concordância entre gêmeos e diferente prevalência e gravidade entre grupos étnicos indicam que componentes genéticos exercem importante papel na patogênese do LES (20). A taxa de concordância de

LES entre gêmeos monozigóticos é de cerca de 40%, enquanto que entre os dizigóticos é de apenas 4% (21). Estudos genômicos identificaram 30 a 40 loci de genes com polimorfismos (ou menos comumente mutações) que predisõem ao LES (22).

Fatores genéticos que conferem razões de risco mais elevadas são deficiência dos componentes iniciais do complemento C1q (mais de 90% dos indivíduos desenvolvem LES), C4A e B, C2 ou a presença de um gene mutante TREX1 (codifica a endonuclease1, enzima de reparo que atua degradando DNA), todos relativamente raros na população (23). Fora isso, não há um único polimorfismo gênico capaz de criar alto risco de LES, sendo necessária a combinação de vários genes de suscetibilidade ou a presença destes somada à ausência de genes protetores para atingir a suscetibilidade genética suficiente capaz de permitir o desenvolvimento da doença (24).

2.4.2 Fatores hormonais

A função imunorregulatória do estradiol, testosterona, progesterona, dehidroepiandrosterona (DHEA) e hormônios pituitários sustenta a hipótese de que eles possam modular a incidência e a gravidade do LES (25).

O papel etiológico dos hormônios no LES pode estar relacionado ao seu efeito na responsividade imune. Os estrógenos estimulam timócitos, células T CD8+ e CD4+, células B e macrófagos. Estimulam também a liberação de certas citocinas e a expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) e de moléculas de adesão de células endoteliais (26). Um efeito potencialmente importante do estradiol é sua habilidade de reduzir a apoptose de células B autorreativas com elevada afinidade por anti-DNA, promovendo a sua maturação seletiva (27). Desta forma, as mulheres estão mais predispostas a produzir autoanticorpos que eventualmente podem levar à expressão clínica de LES. Por outro lado, os andrógenos tendem a ser imunossupressores (28), podendo desempenhar um papel protetor.

A progesterona reduz a proliferação da célula T e aumenta o número de células CD8 (29) e em conjunto com elevados níveis de estrógenos promove uma resposta Th2, que favorece a produção de autoanticorpos (30).

Exacerbações clínicas em pacientes com LES têm sido associadas à hiperprolactinemia (31). Existem também evidências de aumento da incidência de doenças da tireoide (32,33) e anormalidades no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos pacientes com LES (34).

2.4.3 Fatores imunológicos

Existem numerosos defeitos imunes em pacientes com LES, porém, sua etiologia não está completamente clara. Acredita-se que a perda da auto-tolerância cause anormalidades na regulação imunológica e leve ao desenvolvimento de uma resposta autoimune (35).

O LES é mediado por autoanticorpos e pelos imunocomplexos que estes formam com antígenos. Os autoanticorpos podem estar presentes por anos antes da manifestação dos primeiros sintomas da doença (36). Os autoantígenos que eles reconhecem estão presentes na superfície celular, particularmente em células ativadas ou que sofrerão apoptose (37). A fagocitose e a depuração de complexos imunes e células apoptóticas são defeituosa no LES, permitindo a sua persistência (38). Células B e plasmócitos que produzem autoanticorpos estão persistentemente ativadas e suscetíveis à maturação pelo fator ativador de células B (BAAF), também conhecido como estimulador de linfócitos B (BLyS) e por células T helper, aumentando a produção de seus produtos, como IL-6 e IL-10. O BAAF, que tem níveis séricos elevados em alguns pacientes lúpicos, é essencial para a sobrevivência e a maturação das células B imaturas e transicionais em plasmoblastos e células B de memória, favorecendo o desenvolvimento de células B autorreativas (39). Este aumento da persistência de autoanticorpos acaba por não sofrer downregulation adequada pelos anticorpos anti-idiotípicos ou pelas células T regulatórias ou supressoras.

Alguns complexos antígeno-anticorpo ativam o sistema imune inato via receptores *Toll-like (TLR) 7 e 9*, os quais estimulam as células dendríticas a produzir TNF-alfa e interferon tipo 1, as células T a liberar interferon gama, IL-6, IL-10, enquanto células *natural killer (NK)* e células T falham em liberar quantidades adequadas de TGF β . Este padrão de citocinas favorece a contínua formação de autoanticorpos (40). Os TLR também podem atuar através do sistema imune adaptativo, estimulando as células B autorreativas.

Desta forma, tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo favorecem a contínua produção de autoanticorpos nos pacientes com LES, produzindo um perfil imunológico específico, caracterizado pelo desenvolvimento de elevados níveis de anticorpos antinucleares, especialmente contra DNA, partículas ribonucleicas de pequeno tamanho (Sm), ribonucleoproteína (RNP), proteínas associadas a ácidos ribonucleicos (Ro/SSA), fosfoproteínas associadas ao RNA (La/SSB), nucleossomas e outros antígenos nucleares (41,42). Alguns destes autoanticorpos são clinicamente importantes. O FAN é positivo em algum momento no curso da doença em mais de 95% dos pacientes com LES e sua negatividade em repetidos testes sugere que outro diagnóstico deva ser considerado. O anti-DNA de dupla-hélice está associado com maior risco de nefrite; anticardiolipinas, com maior risco de eventos trombóticos e perdas fetais; anti-Ro/La, com maior risco de lúpus neonatal. Porém, nem todos os autoanticorpos são patogênicos. Indivíduos hígidos, por exemplo, produzem normalmente autoanticorpos não-patogênicos, embora em pequenas quantidades. Sendo assim, a variabilidade clínica existente entre diferentes pacientes pode refletir a variabilidade na quantidade e qualidade da resposta imune.

2.4.4 Fatores ambientais

Diversos fatores ambientais podem influenciar o sistema imunológico e de alguma forma contribuir na etiologia do LES. Agentes infecciosos como vírus, bactérias e micobactérias podem causar sintomas semelhantes aos do LES ou até mesmo exacerbações da doença (43,44). Estudos em crianças lúpicas sugerem que a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) possa ser um gatilho para a doença (45). Retrovíroses endógenas também parecem ter este papel (46).

A luz ultravioleta (UV) pode levar os queratinócitos a expressar maior número de pequenas partículas ribonucleicas nucleares (snRNPs) na sua superfície celular (47) e a secretar maior quantidade de IL-1, IL-3, IL-6, fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), estimulando as células B a produzir mais anticorpos. Em adição ao seu efeito local cutâneo, a luz UV pode também estimular a autoimunidade interferindo com o processamento de antígenos através da ativação dos macrófagos. A radiação UV diminui a metilação do DNA da célula T, que pode levar à superexpressão do antígeno 1 associado à função do linfócito (LFA-1) (48). Estas células T podem então se tornar autorreativas resultando na formação de autoanticorpos.

Poeira de sílica pode aumentar o risco de desenvolver LES, especialmente em mulheres afroamericanas (49). Alergias a medicações, sobretudo antibióticos, são relatadas mais frequentemente em pacientes com diagnóstico recente de LES que em controles saudáveis (50). Uma meta-análise de estudos sobre uso de álcool e risco de LES concluiu que consumo alcóolico moderado pode ter efeito protetor (51).

2.5 Tratamento do LES e seu impacto na fertilidade

Alguns medicamentos utilizados no tratamento do LES podem prejudicar a fertilidade. Um estudo de coorte holandês realizado recentemente com pacientes portadoras de artrite reumatoide encontrou aumento do tempo até a gestação em pacientes usuárias de AINEs ou prednisona em dose superior a 7,5 mg por dia (52). Este achado sugere possível efeito prejudicial destas medicações comumente usadas também pelas pacientes lúpicas sobre a fertilidade.

A ciclofosfamida tem influência na função ovariana, principalmente em idades mais avançadas. Um trabalho publicado em 2006 encontrou 39% de prevalência de falência ovariana em pacientes tratadas com ciclofosfamida com idade inferior a 30 anos e 59% em pacientes de 30 a 40 anos (53). Um estudo de coorte realizado entre setembro de 2010 e julho de 2011 nos Estados Unidos comparando a história reprodutiva de mulheres jovens portadoras de doença reumatológica com ou sem exposição prévia à ciclofosfamida, concluiu que mais mulheres com exposição prévia à ciclofosfamida tiveram mais amenorreia, nuliparidade e infertilidade (54). De Araújo e colaboradores mostraram que o uso de doses cumulativas elevadas de metotrexato é uma possível causa de disfunção ovariana subclínica em pacientes adultos com LES diagnosticado na infância (55).

2.6 A influência do lúpus eritematoso sistêmico na fertilidade

A autoimunidade pode interferir em diversos aspectos associados à fertilidade causando, por exemplo, alterações da função tubária, falência ovariana, falha de implantação embrionária e perda gestacional. Cerca de 10 a 30% das mulheres com falência ovariana prematura (FOP) tem uma doença autoimune concomitante (56). Reações autoimunes contra os ovários podem ser gerais ou parciais. A evidência de base autoimune para FOP é dada pela presença de autoanticorpos contra células produtoras de esteroides em cerca de 80% das pacientes e ooforite com infiltrado de linfócitos T CD4+ e CD8+ (57).

Um estudo de caso controle realizado em 2009 na Finlândia avaliou a história reprodutiva de mulheres lúpicas comparadas com controles saudáveis. Os autores não encontraram diferença na média de idade por ocasião da menarca e frequência de infertilidade, porém, a menopausa ocorreu mais precocemente entre as pacientes lúpicas (58).

Sugere-se que a fertilidade possa estar reduzida em algumas pacientes por causa de irregularidades menstruais e ciclos anovulatórios durante atividade da doença e administração de elevadas doses de corticoide (59). Algum grau de irregularidade menstrual está presente em até 53% das pacientes com LES e idade

abaixo de 40 anos e pacientes com maior atividade de doença apresentam maior frequência de alterações menstruais (60).

Um estudo de caso-controle recente realizado no Brasil avaliou marcadores de reserva ovariana em 27 pacientes com LES e em 27 controles, tanto casos como controles com ciclos menstruais regulares. A contagem folicular antral foi significativamente menor nas pacientes lúpicas e mostrou correlação negativa com o índice de dano orgânico e com a dose cumulativa de ciclofosfamida. Os níveis de hormônio anti-Mülleriano tiveram correlação negativa com a dose máxima de corticoide já usado. Estes resultados sugerem que a reserva ovariana possa também estar reduzida em pacientes com LES mesmo com ciclos menstruais regulares (61). A função ovariana pode ser reduzida pela ooforite autoimune no LES, levando à FOP (62). Nefrite lúpica pode resultar em doença renal terminal e amenorreia, juntamente com hiperprolactinemia (63). Cerca de um terço das mulheres com LES apresenta anticorpos antifosfolípidos, o que pode explicar a associação entre LES e perdas gestacionais (64).

2.7 O hormônio anti-Mülleriano como marcador de reserva ovariana

O número de ovócitos atinge o máximo de 6 a 7 milhões por volta da vigésima semana de gestação e, por um processo contínuo de atresia/apoptose, apenas 1 a 2 milhões de folículos alcançam o período neonatal (65). Apenas as ovogônias que entram em meiose sobreviverão à atresia no ovário fetal antes do nascimento. Na menarca, cerca de 300 mil são viáveis. A mulher irá utilizar cerca de 500 folículos primordiais durante os anos reprodutivos. Na época da menopausa, o ovário será formado por estroma denso e raros ovócitos remanescentes dispersos (66).

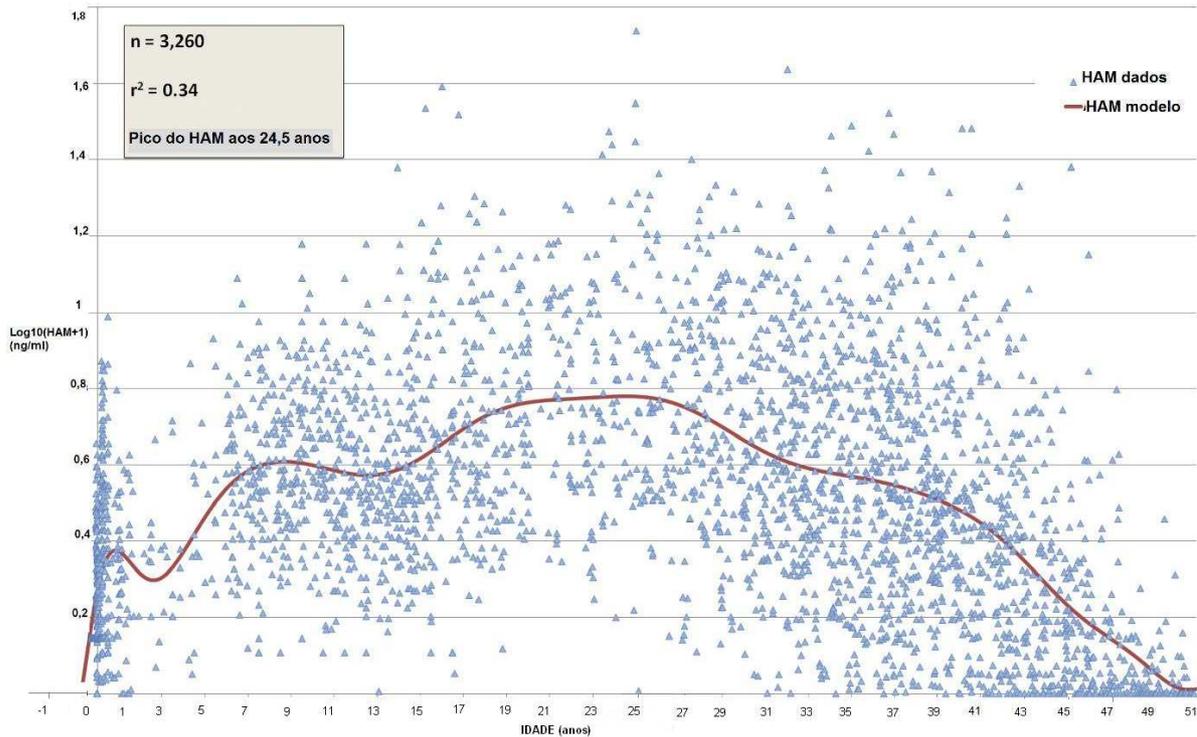
O crescimento folicular é iniciado no feto em um padrão contínuo e está relacionado com a massa total de folículos e com fatores liberados por folículos atrésicos. Ciclos de crescimento folicular e subsequente atresia iniciam antes do nascimento e continuam através dos anos reprodutivos. A viabilidade do ovócito declina na mulher mais velha em idade reprodutiva antes que ela tenha qualquer decréscimo mensurável na concentração hormonal sérica ou intrafolicular (67). A

menopausa é associada com um marcado declínio no número de ovócitos que é atribuído à atresia progressiva do *pool* de ovócitos original. Contudo, a evidência da depleção absoluta de ovócitos atualmente é limitada (67).

O hormônio anti-Mülleriano (HAM), também chamado de “substância anti-Mülleriana” é um polipeptídeo membro da família do TGF β . Está envolvido na diferenciação sexual do embrião masculino, sendo produzido pelas células de Sertoli nos testículos, induzindo a regressão do ducto Mülleriano, precursor embriológico do trato reprodutivo feminino (68).

Em indivíduos do sexo feminino, começa a ser expresso no ovário fetal após a 36^a semana de gestação. As meninas apresentam um pico no nível sérico do HAM logo após o nascimento, seguido por um aumento sustentado até aproximadamente os 9 anos de idade. Durante a puberdade (9 a 15 anos) ocorre uma inflexão na curva e até mesmo uma pequena queda, sucedida por uma segunda fase de aumento, atingindo um pico por volta dos 25 anos. Após isso, inicia um declínio constante, alcançando níveis indetectáveis na idade média de 50-51 anos, correspondendo à menopausa (69). A figura 2 mostra a variação do nível sérico do HAM ao longo da vida em indivíduos do sexo feminino.

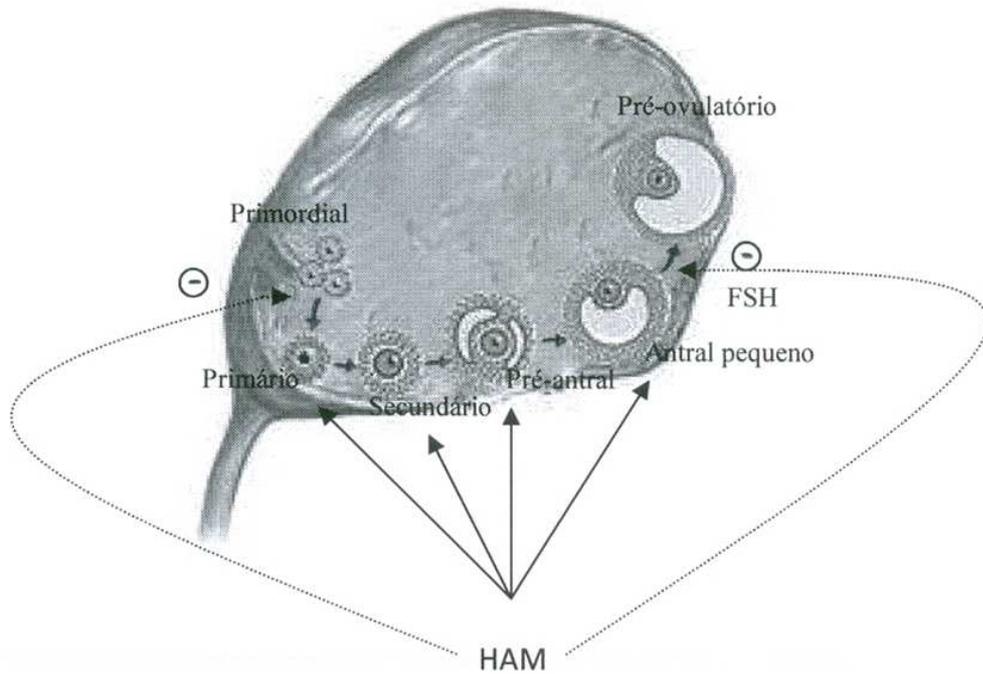
Figura 2. Variação do nível sérico do HAM ao longo da vida



Reproduzido mediante autorização de Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, et al. (2011) A Validated Model of Serum Anti-Müllerian Hormone from Conception to Menopause. PLoS ONE 6(7): e22024. doi:10.1371/journal.pone.0022024.

O HAM é secretado apenas pelas células da granulosa dos folículos ovarianos em crescimento: primários, secundários, pré-antrais e antrais pequenos, sendo produzido em maior nível pelos dois últimos (70). Ele possui dois principais mecanismos de ação no ovário: inibe o recrutamento inicial dos folículos primários a partir dos folículos primordiais (71,72) e, secundariamente, inibe a sensibilidade dos folículos antrais ao hormônio folículo-estimulante (FSH) durante o recrutamento cíclico (73) (Figura 3). Desta forma, o HAM previne a depleção prematura dos folículos (74). Apesar do prefixo “anti”, o HAM não tem papel na produção de anticorpos.

Figura 3. Hormônio anti-Mülleriano e foliculogênese



O hormônio anti-Mülleriano (HAM) é secretado pelos folículos em crescimento e sua produção aumenta ao longo do desenvolvimento folicular. Os níveis mais altos são secretados pelos folículos pré-antrais e antrais pequenos. O HAM inibe o recrutamento inicial dos folículos primários a partir do *pool* de folículos primordiais e reduz a sensibilidade dos folículos antrais ao hormônio folículo-estimulante (FSH) durante o recrutamento cíclico.

O termo “reserva ovariana” descreve o número e a qualidade dos ovócitos remanescentes nos ovários. A quantidade de folículos primordiais remanescentes parece se correlacionar com o número de folículos que entram em crescimento. Como apenas os folículos em crescimento produzem HAM, seus níveis plasmáticos refletem a quantidade de folículos primordiais remanescentes (75). Estudos em camundongos (76) e em macacos (77) têm mostrado forte correlação entre níveis de HAM e o número de folículos primordiais.

Outros testes atuais para estimar a reserva ovariana incluem marcadores ultrassonográficos (contagem de folículos antrais e medida do volume ovariano) e

marcadores hormonais (FSH, estradiol e inibina B). Estes testes refletem direta ou indiretamente a quantidade de folículos antrais remanescentes.

A contagem de folículos antrais (CFA) e a medida do volume ovariano são medidas ultrassonográficas diretas e têm o inconveniente de exigir a realização de ultrassonografia transvaginal. Devem ser realizadas preferencialmente no início da fase folicular, embora uma coorte retrospectiva não tenha encontrado diferença na predição de pobre resposta ovariana quando medidas foram feitas em diferentes fases do ciclo menstrual (78).

A CFA é realizada visualizando-se os ovários nos planos transversal e longitudinal e contando-se os folículos com diâmetro entre 2 a 10 mm. O tamanho dos folículos é a média de dois diâmetros perpendiculares, um dos quais deve ser o de maior dimensão de cada folículo (79). Uma CFA baixa (entre 4 a 10) sugere pobre reserva ovariana (80). A CFA tem uma boa correlação com o HAM (81), apresenta elevada especificidade, porém, tem baixa sensibilidade, o que acaba por limitar seu uso clínico (82).

O volume ovariano é calculado usando-se a fórmula de um elipsoide ($D1 \times D2 \times D3 \times \pi / 6$), na qual utiliza-se a medida de 3 diâmetros perpendiculares (longitudinal, ântero-posterior e transversal). O volume ovariano permanece inalterado até o período perimenopausa e não adiciona valor preditivo à CFA (83). O declínio do volume ovariano é um evento tardio, observado em mulheres com mais de 40 anos (84).

Na fase folicular inicial os níveis de inibina B e de estradiol são considerados dependentes do número de folículos antrais. Os níveis de FSH são regulados por *feedback* negativo destes dois produtos da célula granulosa, por isso, eles refletem mais indiretamente o *pool* de folículos antrais. O declínio associado à idade no número de ovócitos leva à redução dos níveis de estradiol e inibina B e, conseqüentemente, ao aumento do FSH (85).

Os níveis de FSH devem ser medidos preferencialmente no terceiro dia do ciclo menstrual. O teste é barato e de fácil realização, porém possui variabilidade diurna, intra e interciclo menstrual (86,87). A utilidade desse teste é limitada pela falta de padronização dos ensaios. Existem diferenças de até 3 vezes nas medidas de FSH na mesma amostra de soro com diferentes ensaios (88).

A inibina B é uma glicoproteína heterodimérica liberada pelas células da granulosa dos folículos ovarianos. Um decréscimo dos níveis de inibina B provavelmente precede o aumento da concentração do FSH (89). Contudo, alguns trabalhos falharam em mostrar qualquer valor preditivo adicional na medida da reserva ovariana (90,91), inclusive quando em níveis muito baixos (92).

Uma meta-análise concluiu que os níveis basais de estradiol não acrescentam valor preditivo aos outros testes comumente usados para avaliação da reserva ovariana, não recomendando seu uso rotineiro na prática clínica (93).

Comparado com estes marcadores hormonais, os níveis plasmáticos do HAM parecem associarem-se melhor com o declínio longitudinal dos ovócitos/folículos ao longo do tempo, mesmo antes da ocorrência de ciclos irregulares (94). Em contraste com as flutuações cíclicas características do FSH, estradiol e inibina B, o HAM mostra flutuação intracíclica pequena ou ausente (70, 95, 96).

Existem, contudo, algumas condições que podem causar variabilidades nos níveis séricos do HAM. O uso de contraceptivos hormonais orais reduz significativamente os níveis do HAM, como demonstrado em estudo de coorte com 863 mulheres (228 usuárias de anticoncepcional oral e 504 não-usuárias) em que as usuárias apresentaram níveis 29,8% mais baixos que as controles (97, 98) e, segundo outro estudo, esta redução ocorre independente da via de administração do anticoncepcional (99).

Em relação à gestação, o único estudo longitudinal realizado, composto por 60 pacientes, mostrou redução significativa dos níveis do HAM no segundo e

terceiro trimestres em comparação com o primeiro (100). Recentemente, Köninger e colaboradores confirmaram estes resultados através de um estudo transversal (101).

Existem resultados contraditórios em relação ao HAM e tabagismo. Alguns estudos encontraram redução dos níveis de HAM em tabagistas (102, 103). Em outros, contudo, os níveis foram similares (104, 105, 106).

Alguns trabalhos indicaram uma associação inversa entre o índice de massa corporal (IMC) e os níveis de HAM (107, 108), porém este achado não tem sido consistente (109, 110). Um estudo recente mostrou que esta associação é idade-dependente, sugerindo ser secundária à forte associação do HAM e do IMC com a idade (111).

Em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) os níveis séricos do HAM são 2 a 4 vezes mais altos que em mulheres saudáveis (112,113). A causa de tal elevação ainda não é completamente compreendida, porém existe evidência de que este aumento seja secundário a uma propriedade intrínseca das células da granulosa (114). Além disso, há correlação positiva entre os níveis de andrógenos e de HAM nestas pacientes, podendo eles também ter algum papel nesta elevação (115,116,117).

Recentes estudos mostraram que os níveis de HAM podem variar de acordo com a etnicidade, com mulheres afroamericanas e hispânicas apresentando níveis mais baixos dos que os encontrados em caucasianas (118, 119).

Diversos estudos prospectivos longitudinais envolvendo mais de 11 anos de seguimento de mulheres normo-ovulatórias têm mostrado que o HAM é o melhor marcador endócrino na avaliação do envelhecimento ovariano e que os níveis plasmáticos do HAM, com acurácia razoável, podem prever o início da menopausa (120).

O HAM parece ser um indicador precoce, confiável e direto do declínio da função ovariana, contudo, não há consenso no que diz respeito aos valores limiares apropriados. Além disso, existem trabalhos mostrando grande dispersão das concentrações séricas do HAM em populações comparáveis obtidas através de dois diferentes imunoensaios ultra sensíveis disponíveis no mercado – *AMH Beckman Coulter ELISA* e *AMH Diagnostic System laboratories (DSL) ELISA*. Como exemplo,

um estudo encontrou níveis de HAM cerca de 4,6 vezes menores com o kit DSL, mostrando que o ponto de corte varia de acordo com o ensaio utilizado (121). Já um outro trabalho analisando a correlação entre três ensaios diferentes (Active MIS/AMH ELISA, DSL; EIA AMH/MIS, IOT; AMH Gen II, Beckman Coulter) encontrou concentrações de HAM apenas ligeiramente mais altas quando utilizado o kit Gen II, mostrando boa correlação entre os três kits (122). Outro estudo avaliando reserva ovariana em pacientes com doença de Behçet, também encontrou resultados similares e forte correlação ao dosar o HAM com 2 diferentes kits (AMH Gen II, Beckman Coulter; US AMH/MIS AnshLabs ELISA) (123).

Em estudos que avaliaram taxa de sucesso com fertilização *in vitro*, níveis séricos de HAM menores de 0,5 ng/mL sugeriram fortemente depleção folicular enquanto níveis séricos $\geq 1,26$ ng/mL foram consistentes com uma boa reserva ovariana, utilizando o kit AMH Gen II, Beckman Coulter (121,124).

2.8 Avaliação da reserva ovariana em pacientes lúpicas pré-menopáusicas através do hormônio anti-Mülleriano

Poucos estudos utilizando o HAM na avaliação de reserva ovariana em pacientes com LES foram feitos até o momento. Um estudo de caso-controle realizado na Alemanha entre fevereiro de 2009 e maio de 2010 analisou a influência do LES na reserva ovariana levando em consideração atividade de doença e seu tempo de duração. A reserva ovariana foi determinada através da dosagem do HAM em 33 pacientes lúpicas pré-menopáusicas, sem exposição prévia à ciclofosfamida e em 33 pacientes controles pareadas pela idade. Os níveis de HAM nas pacientes com LES foram significativamente mais baixos que nos controles saudáveis pareados pela idade. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao número de filhos e abortos e não houve correlação entre o nível de HAM e o tempo de duração da doença ou o SLEDAI como indicador de atividade de doença (125).

Coorte chinesa de 216 pacientes com LES acompanhada entre junho e outubro de 2009, estudou o nível de HAM e sua relação com a idade e exposição prévia à ciclofosfamida. O nível médio de HAM foi significativamente mais baixo em pacientes previamente expostas à ciclofosfamida, ajustadas para a idade. Porém, não houve diferença significativa nesta média quando comparado usuárias ou não de outros imunossupressores como micofenolato de mofetila, azatioprina e inibidores da calcineurina (126).

Estudo de caso-controle realizado em 2012 na França encontrou níveis baixos de HAM em pacientes lúpicas, com decréscimo significativo associado à idade e ao uso prévio de ciclofosfamida. Apesar disso, o risco de insucesso gestacional foi baixo (15,8%), sendo que o uso prévio de ciclofosfamida foi fator preditor estatisticamente significativo (127).

Estudo de caso-controle com número reduzido de pacientes (27 em cada grupo) realizado no Brasil encontrou valores médios de reserva ovariana semelhantes nos dois grupos, porém, as pacientes com LES apresentaram mais ampla distribuição de valores do HAM. A função ovariana foi mais comprometida em pacientes com maior dose cumulativa de ciclofosfamida e com maiores escores de dano de doença (128).

A tabela 1 mostra os resultados mais relevantes dos principais artigos publicados até o momento avaliando a reserva ovariana através da dosagem do HAM em pacientes com LES.

Tabela 1. Resumo dos principais artigos publicados avaliando a reserva ovariana através do HAM em pacientes com LES

Estudo	Delineamento	Seguimento	Resultados principais
Lawrenz B et al ⁽¹²⁵⁾	Caso-controle, 33 pacientes em cada grupo	Fevereiro de 2009 a maio 2010, Alemanha	Níveis de HAM significativamente mais baixos nas pacientes com LES
Mok CC et al ⁽¹²⁶⁾	Coorte, 216 pacientes com LES	Junho a outubro de 2009, China	O nível médio de HAM foi significativamente mais baixo em pacientes previamente expostas à CYC
Morel N et al ⁽¹²⁷⁾	Caso-controle, 56 pacientes em cada grupo	2012, França	Níveis mais baixos de HAM em pacientes com LES, com decréscimo significativo associado à idade e ao uso prévio de CYC
Malheiro OB et al ⁽¹²⁸⁾	Caso-controle, 27 pacientes em cada grupo	Brasil	Valores médios de reserva ovariana semelhantes nos dois grupos. Pacientes com LES apresentaram mais ampla distribuição dos valores do HAM
Ma W et al ⁽¹²⁹⁾	Caso-controle, 23 pacientes com LES virgens de tratamento citotóxico, 19 que receberam CYC e 21 controles hígdos	China	Os níveis de HAM foram significativamente mais baixos em pacientes com LES em relação aos controles, porém, não se observou diferença entre os usuários de CYC ou não
Velarde-Ochoa MD et al ⁽¹³⁰⁾	Estudo transversal, 65 pacientes com LES	Março a agosto de 2011, México	Não houve correlação entre o uso de CYC, atividade de doença e os níveis de HAM
Chen D et al ⁽¹³¹⁾	Caso-controle, 77 pacientes com LES e 38 controles saudáveis	China	Pacientes com LES e idade > 30 anos, e sob a exposição à CYC > 10 g apresentam níveis mais reduzidos de HAM
de Araujo D et al ⁽⁶⁵⁾	Caso-controle, 57 pacientes adultas com LES diagnosticado na infância e 21 controles saudáveis	Brasil	Correlação negativa entre a dose cumulativa de MTX e os níveis de HAM

LES: lúpus eritematoso sistêmico; CYC: ciclofosfamida; HAM: hormônio anti-Mülleriano; MTX: metotrexato.

3 Objetivos

3.1 Objetivo principal

Estimar a reserva ovariana através da dosagem do hormônio anti-Mülleriano em pacientes com LES e compará-la com a de controles hígidos.

3.2 Objetivos secundários

Estabelecer a associação entre a reserva ovariana e índices de atividade (SLEDAI) e cronicidade (SLICC *damage index*) de doença em pacientes com LES..

Avaliar a influência do tratamento com ciclofosfamida e outras drogas citotóxicas na reserva ovariana de pacientes lúpicas medida pelo HAM.

Determinar o impacto do tabagismo, do índice de massa corporal e da etnicidade na reserva ovariana de pacientes lúpicas medida pelo HAM.

4. Referências bibliográficas da revisão da literatura

1. Swaak AJ, Huysen V, Nossent JC, and Smeenk RJ. Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 1990 Mar;9(1Suppl1):82-94.
2. Appenzeller S, Bлатыта PF, Costallat LT. Ovarian failure in SLE patients using pulse cyclophosphamide: comparison of different regimes. *Rheumatol Int*. 2008;28:567-71.
3. Burney RO, Schust DJ, Yao MWM. Cap 30, Infertility, 2007. In: Berek JS (ed) *Berek and Novak's gynecology*, 14th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 1185–1276.
4. Pfeifer S, Goldberg J, McClure RD, Lobo R, Thomas M, Widra E, et al. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1407-15.
5. La Marca A , Spada E, Grisendi V, Argento C, Papaleo E, Milani S, et al. Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;163:180–4.
6. Trager J, Ward MM. Mortality and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2001;13(5):345-51.
7. Cervera R, Khamashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, et al. Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(5):299-308.
8. Urowitz MB, Gladman DD, Tom BD, Ibañez D, Farewell VT. Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 2008;35(11):2152-8.
9. Stoll T, Sutcliffe N, Mach J, Klaghofer R, Isenberg DA. Analysis of the relationship between disease activity and damage in patients with systemic lupus erythematosus--a 5-yr prospective study. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(8):1039-44.
10. Michet CJ Jr, McKenna CH, Elveback LR. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc*. 1985;60:105-13.
11. Siegel M, Lee SL. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1973;3:1-54.
12. Vilar MJP, Rodrigues JM, Sato EI. Incidence of systemic lupus erythematosus in Natal, RN, Brazil. *Rev Bras Reumatol*. 2003;43(6): 347-51.
13. Hochberg MC, Perlmuter DL, Medsger TA. Prevalence of self-reported physician-diagnosed systemic lupus erythematosus in the USA. *Lupus*. 1995;4(6):454-6.
14. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*. 2007;56(6):2092-4.

15. Thoma ME, McLain AC, Louis JF. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertil Steril*. 2013;99 (5):1324-31.
16. Chandra A, Copen CE, Stephen EH. Infertility and impaired fecundity in the United States, 1982-2010: data from the National Survey of Family Growth. *Natl Health Stat Report*. 2013;67:1-18.
17. Petri M, Allbritton J. Fetal outcome of lupus pregnancy: a retrospective case-control study of the Hopkins Lupus Cohort. *J Rheumatol*. 1993;20:650-6.
18. Khamashta MA, Hughes GR. Pregnancy in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1996;8:424-9.
19. Riemakasten G and Hiepe F. Autoantibodies. In: Duboi's Lupus Erythematosus and Related Syndromes, 8, Wallace DJ and Hahn BH. (Ed), Elsevier Saunders, Philadelphia 2013.p.282.
20. Harley JB, Kelly JA, Kaufman KM. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol*. 2006;28:119-30.
21. Block SR: A brief history of twins. *Lupus*. 2006;15:61-4.
22. Graham RR, Hom G, Ortmann W, Behrens TW. Review of recent genome-wide association scans in lupus. *J Intern Med*. 2009;265 (6):680-8.
23. Hawn TR, Wu H, Grossman JM. A stop codon polymorphism of Toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:10593-7.
24. Orrú V, Tsai SJ, Rueda B. A loss-of-function variant of PTPN22 is associated with reduced risk of systemic lupus erythematosus. *Hum Mol Genet*. 2009; 18:569-79.
25. McMurray RW, May W. Sex hormones and systemic lupus erythematosus: review and meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2003;48:2100-10.
26. Cutolo M, Sulli A, Seriolo B. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol*. 1995; 13:217-26.
27. Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Grimaldi CM. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;305:67-88.
28. Lahita RG. Sex hormones and the immune system – Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol*. 1990; 4:1-12.
29. Clemens LE, Siiteri PK, Stites DP. Mechanism of immunosuppression of progesterone on maternal lymphocyte activation during pregnancy. *J Immunol*. 1979;122:1978-85.
30. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1999; 11:352-6.
31. Blanco-Favela F, Quintal-Alvarez G, Leños-Miranda A. Association between prolactin and disease activity in systemic lupus erythematosus. Influence on statistical power. *J Rheumatol*. 1999; 26:55-9.
32. Weetman AP, Walport MJ. The association of autoimmune thyroiditis with systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol*. 1987; 26:359-61.
33. Goh KL, Wang F. Thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 1986; 45:579-83.

34. Glück T, Oertel M, Reber T. Altered function of the hypothalamic stress axes in patients with moderately active systemic lupus erythematosus. I. The hypothalamus-autonomic nervous system axis. *J Rheumatol.* 2000; 27:903-10.
35. Elkon K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1995; 7:384-8.
36. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003; 349:1526-33.
37. Graham KL, Utz PJ. Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17:513-7.
38. Muñoz LE, Janko C, Grossmayer GE. Remnants of secondarily necrotic cells fuel inflammation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2009; 60:1733-42.
39. Hahn BH. Belimumab for systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2013; 368:1528-35.
40. Gerl V, Lischka A, Panne D. Blood dendritic cells in systemic lupus erythematosus exhibit altered activation state and chemokine receptor function. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69:1370-7.
41. Chabre H, Amoura Z, Piette JC. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1995; 38:1485-91.
42. Pisetsky DS. Autoantibodies and their significance. *Curr Opin Rheumatol.* 1993; 5:549-56.
43. Steinberg AD. Insights into the basis of systemic lupus. *J Autoimmun.* 1995;8:771-5.
44. Via CS, Handwerker BS. B-cell and T-cell function in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1993;5:570-4.
45. James JA, Kaufman KM, Farris AD. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in Young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1997; 100:3019-26.
46. Pearl A, Fernandez D, Telarico T, Phillips PE. Endogenous retroviral pathogenesis in lupus. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22:483-92.
47. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens target in systemic lupus erythematosus are clustered in two population of surfasse structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994; 179:1317-30.
48. Yung R, Powers D, Johnson K. Mechanisms of drug-induced lupus. II. T cells overexpressing lymphocyte function-associated antigen 1 become autoreactive and cause a lupuslike disease in syngeneic mice. *J Clin Invest.* 1996;97:2866-71.
49. Finckh A, Cooper GS, Chibnik LB. Occupational silica and solvent exposures and risk of systemic lupus erythematosus in urban women. *Arthritis Rheum.* 2006; 54:3648-54.
50. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL. Risk factors for development of systemic lupus erythematosus; allergies, infections, and Family history. *J Clin Epidemiol.* 2002; 55:982-9.

51. Wang J, Pan HF, Ye DQ. Moderate alcohol drinking might be protective for systemic lupus erythematosus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rheumatol*. 2008; 27:1557-63.
52. Brouwer J, Hazes JM, Laven JS, Dolhain RJ. Fertility in women with rheumatoid arthritis: influence of disease activity and medication. *Ann Rheum Dis*. 2014 May 15. pii: annrheumdis-2014-205383. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205383.
53. Manger K, Wildt L, Kalden JR, Manger B. Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO study. *Autoimmun Rev*. 2006;5:269-72.
54. Harward LE, Mitchell K, Pieper C, Copland S, Criscione-Schreiber LG, Clowse MEB. The impact of cyclophosphamide on menstruation and pregnancy in women with rheumatologic disease. *Lupus*. 2013;22:81-6.
55. de Araujo D, Yamakami L, Aikawa N, Bonfá E, Viana V, Pasoto S, et al. Ovarian reserve in adult patients with childhood-onset lupus: a possible deleterious effect of methotrexate? *Scand J Rheumatol*. 2014;Jun 2:1-9.
56. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N England J Med*, 2009;360:606-14.
57. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev*. 1997;18:107-34.
58. Ekblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P, Helve T, Leirisalo-Repo M, Julkunen H. Reproductive health in women with systemic lupus erythematosus compared to population controls. *Scand J Rheumatol*. 2009;38:375-80.
59. Gayed M, Gordon C. Pregnancy and rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:1634-40.
60. Shabanova SS, Ananieva LP, Alekberova ZS, Guzov II. Ovarian function and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 may-jun;26(3):436-41.
61. Malheiro OB, Rezende CP, Rocha AL, Del Puerto HL, Ferreira GA, Reis FM. Regular menstrual cycles do not rule out ovarian damage in adult women with systemic lupus erythematosus. *Gynecol Endocrinol*. 2014 Jun 5:1-4.
62. Carp HJA, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*. 2012; 38:J266 e J274.
63. Gomez F, de la Cueva R, Wauters JP, Lemarchand-Beraud T. Endocrine abnormalities in patients undergoing long-term hemodialysis. The role of prolactin. *Am J Med*. 1980;68:522-30.
64. Bizarro N, Tonutti E, Villalta D, Tampoia M, Tozzoli R. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129: 61-8.
65. Peters H, Byskov AG, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries in humans and other primates. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 7(3):469-85.
66. Freitas, Menke, Rivoir & Passos. *Rotinas em Ginecologia*, sexta edição, 2011. Artmed.

67. Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65(6):1231-7.
68. Lee MM, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev.* 1993;14:152–64.
69. Kelsey TW, Wright P, Nelson SM, Anderson RA, Wallace WH. A validated model of serum anti-Müllerian hormone from conception to menopause. *PloS one.* 2011;6:e22024.
70. La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2006;21:3103-7.
71. Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction.* 2002 Nov;124(5):601-9.
72. Nilsson E, Rogers N, Skinner MK. Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction.* 2007 Aug;134(2):209-21.
73. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, et al. Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2001 Nov;142(11):4891-9.
74. Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006; 131(1):1-9.
75. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7:1342-6.
76. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology.* 2006;147:3228-34.
77. Appt SE, Clarkson TB, Chen H, Adams MR, Christian PJ, Hoyer PB, et al. Serum anti-Müllerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. *Menopause.* 2009;16:597-601.
78. Rombauts L, Onwude JL, Chew HW, Vollenhoven BJ. The predictive value of antral follicle count remains unchanged across the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 2011;96(6):1514.
79. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EM, Groenewoud ER, Heineman MJ, Hoek A. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod.* 2007 Jul;22(7):1925-31.
80. Jayaprakasan K, Chan Y, Islam R, Haoula Z, Hopkisson J, Coomarasamy A, et al. Prediction of in vitro fertilization outcome at different antral follicle count thresholds in a prospective cohort of 1,012 women. *Fertil Steril.* 2012 Sep;98(3):657-63
81. Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-müllerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Dec;95(12):5144-54.
82. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2012). Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril* 98:1407-15.

83. Hendriks DJ, Kwee J, Mol BW, teVelde ER, Broekmans FJ. Ultrasonography as a tool for the prediction of outcome in IVF patients: A comparative meta-analysis of ovarian volume and antral follicle count. *Fertil Steril*. 2007;87:764–75.
84. Higgins RV, van Nagell JR, Woods CH, Thompson EA, Kryscio RJ. Interobserver variation in ovarian measurements using transvaginalsonography. *Gynecol Oncol*. 1990;39:69–71.
85. Burger HG, Cahir N, Robertson DM. Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;48:809–13.
86. Scott RT Jr, Hofmann GE, Oehninger S, Muasher SJ. Intercycle variability of day 3 follicle-stimulating hormone levels and its effect on stimulation quality in *in vitro* fertilization. *FertilSteril*. 1990;54:297–302.
87. Kwee J, Schats R, McDonnell J, Lambalk CB, Schoemaker J. Intercycle variability of ovarian reserve tests: Results of a prospective randomized study. *Hum Reprod*. 2004;19:590–5.
88. Taylor AE, Khoury RH, Crowley WF Jr. A comparison of 13 different immunometric assay kits for gonadotropins: implications for clinical investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(1):240.
89. Seifer DB, Scott RT, Jr, Bergh PA, Abrogast LK, Friedman CI, Mack CK, et al. Women with declining ovarian reserve may demonstrate a decrease in day 3 serum inhibin B before a rise in day 3 follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril*. 1999;72:63–5.
90. Corson SL, Gutmann J, Batzer FR, Wallace H, Klein N, Soules MR. Inhibin-B as a test of ovarian reserve for infertile women. *Hum Reprod*. 1999;14:2818–21.
91. Hall JE, Welt CK, Cramer DW. Inhibin A and inhibin B reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod*. 1999;14:409–15.
92. Dzik A, Lambert-Messerlian G, Izzo VM, Soares JB, Pinotti JA, Seifer DB. Inhibin B response to EFORT is associated with the outcome of oocyte retrieval in the subsequent *in vitro* fertilization cycle. *Fertil Steril*. 2000;74:1114–7.
93. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*. 2006;12:685–718.
94. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fause BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2002;77:357–62.
95. Hehenkamp WJ, LoomanCW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4057–63.
96. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y. Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007;22:1837–40.

97. Bentzen JG, Forman JL, Pinborg A, Lidegaard O, Larsen EC, Friis-Hansen L, et al. Ovarian reserve parameters: a comparison between users and non-users of hormonal contraception. *Reprod Biomed Online*. 2012;25:612–9.
98. Dólleman M, Verschuren WM, Eijkemans MJ, Dollé ME, Jansen EH, Broekmans FJ, et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-Müllerian hormone in a large population-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:2106–15.
99. Kallio S, Puurunen J, Ruokonen A, Vaskivuo T, Piltonen T, Tapanainen JS. Antimüllerian hormone levels decrease in women using combined contraception independently of administration route. *Fertil Steril*. 2013;99:1305–10.
100. Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ. Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril*. 2010;93:1356–8.
101. Köninger A, Kauth A, Schmidt B, Schmidt M, Yerlikaya G, Kasimir-Bauer S, et al. Anti-Müllerian-hormone levels during pregnancy and postpartum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:60.
102. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause* 2010;17:571–6.
103. Fréour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, et al. Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Arch Gynecol Obstet*. 2012;285:1177–82.
104. Nardo LG, Christodoulou D, Gould D, Roberts SA, Fitzgerald CT, Laing I. Anti-Müllerian hormone levels and antral follicle count in women enrolled in in vitro fertilization cycles: relationship to lifestyle factors, chronological age and reproductive history. *Gynecol Endocrinol*. 2007;23:486–93.
105. Dafopoulos A, Dafopoulos K, Georgoulas P, Galazios G, Limberis V, Tsikouras P, et al. Smoking and AMH levels in women with normal reproductive history. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;282:215–9.
106. Waylen AL, Jones GL, Ledger WL. Effect of cigarette smoking upon reproductive hormones in women of reproductive age: a retrospective analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010;20:861–5.
107. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC, Strauss JF 3rd. Association of anti-müllerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril*. 2007;87:101–6.
108. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S, Edelman A. Antimüllerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. *Contraception*. 2010;81:245–8.
109. Halawaty S, ElKattan E, Azab H, ElGhamry N, Al-Inany H. Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Can*. 2010;32:687–90.
110. Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, Wijdeveld ME, van Disseldorp J, van Dulmen-den Broeder E, et al. Intra-cycle fluctuations of anti-Müllerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012;24:664–9.
111. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, Argento C, Giulini S, Volpe A. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the

- individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilisation cycles. *BJOG*. 2012;119:1171–9.
112. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5957–62.
 113. Park AS, Lawson MA, Chuan SS, Oberfield SE, Hoeger KM, Witchel SF, et al. Serum anti-Mullerian hormone concentrations are elevated in oligomenorrheic girls without evidence of hyperandrogenism. *J Clin Endocr Metab*. 2010;95:1786–92.
 114. Cateau-Jonard S, Jamin SP, Leclerc A, Gonzales J, Dewailly D, di Clemente N. Anti-Mullerian hormone, its receptor, FSH receptor, and androgen receptor genes are overexpressed by granulosa cells from stimulated follicles in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4456–61.
 115. Pigny P, Merlen E, Robert Y, Cortet-Rudelli C, Decanter C, Jonard S, et al. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:5957–62.
 116. Laven JS, Mulders AG, Visser JA, Themmen AP, De Jong FH, Fauser BC. Anti-Mullerian hormone serum concentrations in normoovulatory and anovulatory women of reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:318–23.
 117. Carlsen SM, Vanky E, Fleming R. Anti-Mullerian hormone concentrations in androgen-suppressed women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009; 24:1732–8.
 118. Bleil ME, Gregorich SE, Adler NE, Sternfeld B, Rosen MP, Cedars MI. Race/ethnic disparities in reproductive age: an examination of ovarian reserve estimates across four race/ethnic groups of healthy, regularly cycling women. *Fertil Steril*. 2014 Jan;101(1):199-207.
 119. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Reijo Pera RA. Genetic markers of ovarian follicle number and menopause in women of multiple ethnicities. *Hum Genet*. 2012 Nov;131(11):1709-24.
 120. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod*. 2006;12:685-718.
 121. Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: Comparison and relevance in Assisted Reproduction Technology (ART). *Clin Chim Acta*. 2007 jan; 375(1-2):162-4.
 122. Li HW, Ng EH, Wong BP, Anderson RA, Ho PC, Yeung WS. Correlation between three assay systems for anti-Müllerian hormone (AMH) determination. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Dec;29(12):1443-6.
 123. Mont'Alverne AR, Yamakami LY, Gonçalves CR, Baracat EC, Bonfá E, Silva CA. Diminished ovarian reserve in Behçet's disease patients. *Clin Rheumatol*. 2014 May 31. [Epub ahead of print].
 124. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Human Reproduction*. 2008;23(6):1359–65.

125. Lawrenz B, Henes JC, Henes M, Neunhoeffler E, Schmalzing M, Fehm T, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: Evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus*. 2011;20:1193-7.
126. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65: 206-10.
127. Morel N, Bachelot A, Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Galicier L. Study of anti-müllerian hormone and the relationship with subsequent probability of pregnancy in 112 systemic lupus erythematosus patients exposed or not to cyclophosphamide. The 10th International Congress on SLE, April 18-21 2013, Buenos Aires, Argentina. *Lupus*. 2013;22:16.
128. Malheiro OB, Rezende CP, Ferreira GA, Reis FM. Ovarian reserve markers in reproductive age women with systemic lupus erythematosus. The 10th International Congress on SLE, April 18-21 2013, Buenos Aires, Argentina. *Lupus*. 2013;22:162.
129. Ma W, Zhan Z, Liang X, Chen J, Huang X, Liao C. Subclinical impairment of ovarian reserve in systemic lupus erythematosus patients with normal menstruation not using alkylating therapy. *J Womens Health (Larchmt)*. 2013 Dec;22(12):1023-7.
130. Velarde-Ochoa MD, Esquivel-Valerio JA, Vega-Morales D, Skinner-Taylor CM, Galarza-Delgado DA, Garza-Elizondo MA. Anti-Müllerian hormone in reproductive age women with systemic lupus erythematosus. *Reumatol Clin*. 2014;May 8. pii: S1699-258X(14)00085-0.
131. Chen D, Yuan S, Zhan Z, Zhan Y, Yang X, Liang L. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone in female patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014;94(13):977-80.

5 ARTIGO EM INGLÊS

Assessment of ovarian reserve in premenopausal patients with systemic lupus erythematosus

Andrese Aline Gasparin¹, Lucian Souza¹, Marina Siebert², Ricardo Machado Xavier¹, Rafael Mendonça da Silva Chakr¹, Penélope Esther Palominos¹, Odirlei André Monticielo¹, João Carlos Tavares Brenol¹

¹ Department of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Molecular and Protein Analysis Unit, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Keywords: Anti-Müllerian hormone, ovarian reserve, systemic lupus erythematosus.

Abstract

Objective: The ovarian reserve of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) may be affected by disease activity and medication use. Studies have found that patients with SLE have similar fertility rates to healthy women of the same age. The goal of the present study was to investigate the ovarian reserve of patients with SLE by measuring anti-Müllerian hormone (AMH) levels, and compare it to that of healthy controls.

Method: This was a case-control study performed on 80 premenopausal women, of whom 40 fulfilled the 1997 American College of Rheumatology (ACR) criteria for SLE and 40 healthy controls paired by hormonal contraceptive use. Serum concentrations of AMH in peripheral venous blood were measured using a Human AMH ELISA kit (CUSABIO, Wuhan, China).

Results: AMH serum levels did not differ between patients with SLE and controls (22.79 ± 17.32 ng/ml versus 21.41 ± 16.22 ng/ml, respectively, $p=0.714$), even after adjusting for age (21.03 ± 2.074 ng/ml versus 23.97 ± 2.71 ng/ml; $p=0.56$). AMH levels were not significantly correlated with disease duration ($r=0.2$; $p=0.3$), body mass index (BMI) ($r=0.2$; $p=0.2$) and disease activity [SLEDAI ($r=0.1$; $p=0.7$)] and damage indices

[SLICC ($r=0.1$; $p=0.7$)]. The association between AMH and ethnicity, current smoking, as well as current or prior use of cyclophosphamide and other immunosuppressants was also evaluated.

Conclusion: In this cross-sectional study, women with SLE demonstrated similar AMH levels to healthy controls, suggesting preserved ovarian reserve in this population.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a chronic autoimmune disease with a heterogeneous presentation whose etiology is still uncertain, and which is characterized by autoantibody production and damage to several organs (1). SLE affects predominantly women of reproductive age, whose fertility can be negatively affected both by the disease activity itself and by the medications used to treat it (2,3). Ovarian function can be reduced by autoimmune oophoritis, which may lead to premature ovarian failure (4). Evidence of the gonadotoxic effect of cyclophosphamide, especially in patients older than 30 years (5), of methotrexate (6) and high doses of corticoids (7) has already been reported in the literature.

The term "ovarian reserve" can be defined as the remaining functional capacity of the ovary. It is a predictor of fertility, calculated based on the number and quality of follicles in the ovary at a given time (8). Anti-Müllerian Hormone (AMH) is a dimeric glycoprotein which belongs to the transforming growth factor- β family (TGF β). In the ovary, AMH is secreted by the granulosa cells of growing follicles, and its serum levels have been found to be a reliable marker of ovarian reserve (9). AMH levels also remain relatively stable over the course of the menstrual cycle, which is an advantage over other measures of ovarian reserve (10).

The use of AMH as a marker of ovarian reserve in patients with SLE may contribute to treatment decisions regarding the use of medications with known gonadotoxic effects. However, studies on the topic have provided controversial results (11-18).

In view of these findings, the main goal of this study was to compare AMH-based ovarian reserve between patients with SLE and healthy controls, while controlling for the effects of confounders and medication usage.

Method

This was a case-control study performed at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) from 2010 to 2014. The sample consisted of a cohort of patients seen in the outpatient rheumatology clinic of the HCPA. The inclusion criteria were being female and fulfilling the 1997 *American College of Rheumatology* (ACR) criteria for SLE (19, 20). Control participants consisted of women with no history of rheumatologic or autoimmune disease, recruited from voluntary blood donors of the HCPA. The exclusion criteria for both case and control subjects were as follows: known menopause, confirmed diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS), history of endometriosis, ovarian surgery or radiation, or refusal to participate. Controls were paired by hormonal contraceptive use.

Samples were *frozen* at - 80°C. Serum AMH concentrations in peripheral venous blood were quantified using a Human AMH ELISA (CUSABIO, Wuhan, China) kit. All blood samples were drawn in duplicate on the same day by the same health care professional.

The primary outcome of the study was the comparison of AMH-based ovarian reserve between patients with SLE and healthy controls. Secondary outcomes were the correlation of ovarian reserve and disease duration, body mass index, and disease activity (SLEDAI) (21) and damage (SLICC/ACR *damage index*) (22) in patients with SLE. The association between AMH and ethnicity, current smoking, as well as current or prior use of cyclophosphamide and other immunosuppressants was also evaluated.

Sample size was calculated using the WinPepi software, version 11.1. The minimum sample size required to detect a difference of 1ng/ml AMH with a

significance of 5%, a statistical power of 80%, and further values drawn from a previous study (11), was 52 women (26 per group).

Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies, and compared between groups using Chi-squared or Fisher's exact test. Quantitative results were expressed as mean and standard deviation or median and interquartile range. Student's T-test for independent samples was used for between-group comparisons of quantitative variables and for the evaluation of AMH levels in patients receiving different pharmacological treatments. AMH values were natural log-transformed to improve the normality of distribution. An analysis of covariance (ANCOVA) was used to control for the effect of age on AMH levels. Discrete quantitative variables were compared between groups using the Mann-Whitney test. The association between AMH and other quantitative variables was investigated using Pearson correlations. Levene's test was used to determine the homogeneity of variance of AMH levels. Data were analyzed using the SPSS software, version 18. Results were considered significant at 0.05 (p value).

Results

The characteristics of cases and controls are shown in table 1. Mean age was 32.37 years for cases and 36.30 years for control subjects. These values differed significantly between the two groups ($p=0.045$). No between-group differences were observed with regard to hormonal contraceptive use ($p=0.819$), number of pregnancies ($p=0.666$), miscarriages ($p=0.086$), ethnicity ($p=0.754$), current smoking ($p=0.225$) and BMI ($p=0.357$). Table 2 shows the clinical and laboratorial parameters of patients with SLE. Mean disease duration was 9.45 ± 7.64 years.

Table 1. Sample characteristics

	Group		<i>p</i> ^a
	SLE	Control	
	(n=40)	(n=40)	
Age ± SD (years)	32.37±8.44	36.30±8.81	0.045
Hormonal contraceptive use (%)	15 (37.5)	17 (42.5)	0.819
Pregnancies ^b	1.0 [0.0; 3.0]	1.0 [0.25; 2.0]	0.666
Miscarriages (%)	11 (27.5)	4 (10.0)	0.086
European ancestry (%)	33 (82.5)	35 (87.5)	0.754
Current smoking (%)	9 (22.5)	4 (10.0)	0.225
BMI±SD ^c	25.33±4.90	26.31±4.32	0.357

Abbreviations: SD (standard deviation); BMI (body mass index); SLE (systemic lupus erythematosus)

^a Chi-square test for categorical variables, Mann-Whitney test for asymmetrical quantitative variables or Student's *T* test for symmetrical quantitative variables

^b Median (interquartile range)

^c Kg/m²

Table 2. Clinical and laboratory characteristics of patients with SLE

Patient characteristics	Case group (n=40)
Females (%)	40 (100)
Age \pm SD (years)	32.37 \pm 8.44
Age at diagnosis \pm SD (years)	23.43 \pm 8.10
Disease duration \pm SD (years)	9.45 \pm 7.64
Malar rash (%)	27 (67.5)
Discoid rash (%)	4 (10.0)
Photosensitivity (%)	37 (92.5)
Oral ulcers (%)	18 (45.0)
Arthritis (%)	32 (80.0)
Serositis (%)	10 (25.0)
Nephritis (%)	19 (47.5)
Neurological disorders (%)	6 (15.0)
Hematologic disorders (%)	29 (72.5)
Hemolytic anemia (%)	8 (20.0)
Leuko/lymphopenia (%)	25 (62.5)
Thrombocytopenia (%)	5 (12.5)
Immunologic disorders (%)	27 (67.5)
Anti-dsDNA (%)	22 (55.0)
Anti-Sm (%)	9 (22.5)
Anticardiolipin (%)	6 (15.0)
Lupus Anticoagulant (%)	1 (2.5)
False positive VDRL (%)	3 (7.5)
ANA (%)	40 (100)
Anti-Ro/SSA (%)	19 (47.5)
Anti-La/SSB (%)	8 (20.0)
Anti-RNP (%)	13 (32.5)
Sjögren (%)	3 (7.5)
Antiphospholipid syndrome (%)	0 (0)
SLEDAI ^a	2.0 [0.0; 8.0]
SLICC ^a	0.0 [0.0; 1.0]

Abbreviations: SD (standard deviation); SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index); SLICC (systemic international collaborating clinics).

^a Median [interquartile range].

The mean AMH concentration was 22.79 ± 17.32 ng/ml in patients with SLE and 21.41 ± 16.22 in the control group (figure 1). The difference between these values was nonsignificant ($p=0.714$), and remained so even after controlling for participant age (21.03 ± 2.74 ng/mL and 23.97 ± 2.71 ng/mL, respectively; $p=0.562$). According to Levene's test, the variances of AMH values were homogeneous between cases and controls ($p=0.593$). AMH levels were not correlated with age ($r=0.3$; $p=0.1$), SLEDAI ($r=0.1$; $p=0.7$), SLICC/ACR DI ($r=0.1$; $p=0.7$), disease duration ($r=0.2$; $p=0.3$), or BMI values ($r=0.2$; $p=0.2$). Additionally, no associations were found between AMH levels and current smoking ($p=0.649$) or ethnicity ($p=0.482$). Patients with Sjögren syndrome were found to have lower mean AMH levels than the remainder of the case group (1.89 ng/ml versus 2.91 ng/ml, $p=0.029$). AMH levels did not differ between patients who received cyclophosphamide ($p=0.499$), mofetil or sodium mycophenolate ($p=0.804$), methotrexate ($p=0.927$), or high doses of glucocorticoids ($p=0.821$) or azathioprine ($p=0.487$) treatment, as shown in table 3.

Figure1. Serum levels of anti-Müllerian hormone in case and control subjects

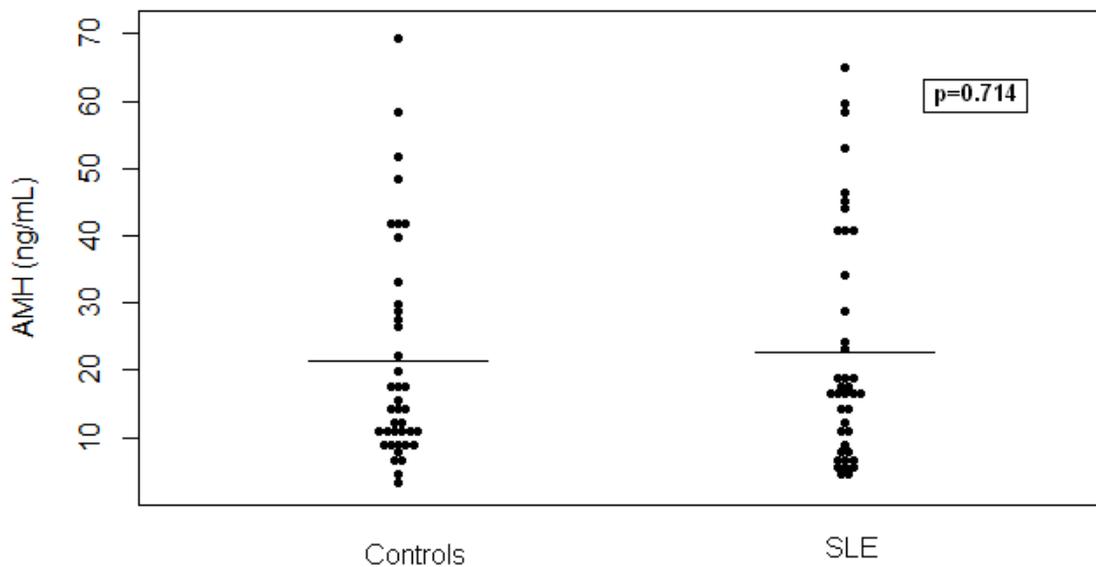


Table 3. Anti-Müllerian hormone levels according to type of immunosuppressive treatment^a

	Ln ^b AMH (ng/mL)		p^c
	Yes	No	
Cyclophosphamide	2.7 (±0.88) [11]	2.89 (±0.77) [29]	0.499
Mycophenolate	2.95 (±0.85) [3]	2.83 (±0.8) [37]	0.804
Methotrexate	2.86 (±1.12) [7]	2.83 (±0.73) [33]	0.927
Azathioprine	2.75 (±0.93) [20]	2.92 (±0.64) [20]	0.487
Glucocorticoids ^d	2.86 (±0.8) [27]	2.79 (±0.81) [13]	0.821

^a Data presented as mean (standard deviation) [number of subjects]

^b Natural logarithm

^c Symmetrical quantitative variables were compared using Student's T-test

^d Dose of immunosuppressant (≥ 1 mg/Kg of prednisone or equivalent)

Discussion

The present study revealed no differences in ovarian reserve between patients with SLE and healthy controls. Our findings corroborate those of a previous Brazilian study (14), although, unlike the study in question, AMH levels in the present study did not exhibit greater variance in patients than in controls. Recent studies of AMH levels have produced conflicting results regarding the reduction in ovarian reserve in women with SLE (11-16).

SLE activity may cause autoimmune reactions in the ovaries which may result in reduced ovarian reserve (23). However, in the present study, AMH levels were not found to be correlated with SLEDAI or SLICC/ACR DI values. This finding may be attributable to the low disease activity and damage indices in the case group.

In the present sample, AMH levels did not differ between patients with European vs. non-European ancestry. These findings differ from those of studies which have found AMH levels to differ among ethnic groups. Two studies in the literature have found African-American and Hispanic females to have lower AMH levels than caucasian females (24, 25). The present findings may be attributable to the miscegenation of the Brazilian population (26).

We also found no influence of BMI on the ovarian reserve of patients with SLE. The literature on the topic has produced conflicting results. Some authors have found inverse associations between BMI and AMH levels (27,28). However, other studies have produced similar results to our own (29,30). According to a recent study, the association between BMI and AMH may be mediated by age, since both of these variables change significantly over time (31).

Findings regarding the influence of current smoking on AMH-based ovarian reserve status are also conflicting. While some studies have found lower AMH levels in smokers (32, 33), other have reported no differences between the AMH levels of smokers and non-smokers (34, 35, 36). In the present study, no associations were found between current smoking and ovarian reserve.

No other studies have identified associations between Sjögren syndrome and reduced ovarian reserve. However, this may be a chance finding due to the small number of patients with this syndrome in the sample. Although the literature on the topic is scarce, the rheumatoid factor, whose levels tend to be higher in patients with this syndrome, may interfere with ELISA measurements of AMH (37).

The association between AMH levels and exposure to cyclophosphamide and other immunosuppressants has already been studied in the literature, and a Chinese cohort study of 216 patients with SLE found that the 48 patients (22%) exposed to cyclophosphamide had lower mean

AMH levels than the remainder of patients, even after adjusting for age (1.58 ± 2.92 versus 1.73 ± 2.11 ng/ml; $p=0.04$) (12). Exposure to other immunosuppressants (mofetil mycophenolate, azathioprine and calcineurin inhibitors) was not found to be associated with AMH levels (12). The present results did not find an association between exposure to cyclophosphamide or other immunosuppressants and reduced ovarian reserve. However, this may have been due to the low statistical power of the sample, since this was a secondary outcome and the number of included patients was low.

Our findings must be interpreted in light of some limitations. The variation in AMH measurement techniques used in different studies may affect the comparison between our findings and those obtained in other investigations. Additionally, the fact that case subjects were significantly younger than controls may have contributed to the higher levels of ovarian reserve in the former. As such, the age difference between groups may have been the only factor responsible for the absence of a difference in AMH levels. The analysis of covariance was also limited by our small sample size, although this bias was minimized by the use of an ANCOVA. The small number of patients also limited the power of subanalyses.

In conclusion, our results suggested that patients with SLE and healthy controls have similar ovarian reserve, even after adjusting for age. Knowledge regarding ovarian reserve levels is fundamental for treatment planning, as it allows doctors to avoid prescribing gonadotoxic drugs to women who may still have some residual ovarian activity and wish to have a children. AMH levels provide a practical and reliable measure of ovarian reserve. However, the measurement of AMH levels using different immunoassay procedures must still be further investigated in different populations of patients with SLE.

Financial Support

FIPE - Research Support Fund of the Clinical Hospital of Porto Alegre.

References

1. Swaak AJ, Huysen V, Nossent JC, and Smeenk RJ. Antinuclear antibody profiles in relation to specific disease manifestations of systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 1990 Mar;9(1Suppl1):82-94.
2. Gayed M, Gordon C. Pregnancy and rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46:1634-40.
3. Appenzeller S, Blatyta PF, Costallat LT. Ovarian failure in SLE patients using pulse cyclophosphamide: comparison of different regimes. *Rheumatol Int*. 2008;28:567-71.
4. Carp HJA, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *Journal of Autoimmunity*. 2012; 38:J266 e J274.
5. Manger K, Wildt L, Kalden JR, Manger B. Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the PREGO study. *Autoimmun Rev*. 2006;5:269-72.
6. de Araujo D, Yamakami L, Aikawa N, Bonfá E, Viana V, Pasoto S, et al. Ovarian reserve in adult patients with childhood-onset lupus: a possible deleterious effect of methotrexate? *Scand J Rheumatol*. 2014;Jun 2:1-9.
7. Brouwer J, Hazes JM, Laven JS, Dolhain RJ. Fertility in women with rheumatoid arthritis: influence of disease activity and medication. *Ann Rheum Dis*. 2014 May 15. pii: annrheumdis-2014-205383. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205383.
8. Pfeifer S, Goldberg J, McClure RD, Lobo R, Thomas M, Widra E, et al. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Dec;98(6):1407-15.
9. La Marca A, Spada E, Grisendi V, Argento C, Papaleo E, Milani S, et al. Normal serum anti-Müllerian hormone levels in the general female population and the relationship with reproductive history. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012;163:180-4.
10. Hehenkamp WJ, LoomanCW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4057-63.
11. Lawrenz B, Henes JC, Henes M, Neunhoeffler E, Schmalzing M, Fehm T, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on ovarian reserve in premenopausal women: Evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus*. 2011;20:1193-7.
12. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65: 206-10.
13. Morel N, Bachelot A, Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Galicier L. Study of anti-müllerian hormone and the relationship with subsequent probability of pregnancy in 112 systemic lupus erythematosus patients exposed or not to cyclophosphamide. The 10th International Congress on SLE, April 18-21 2013, Buenos Aires, Argentina. *Lupus*. 2013;22:16.
14. Malheiro OB, Rezende CP, Ferreira GA, Reis FM. Ovarian reserve markers in reproductive age women with systemic lupus erythematosus. The 10th International Congress on SLE, April 18-21 2013, Buenos Aires, Argentina. *Lupus*. 2013;22:162.
15. Ma W, Zhan Z, Liang X, Chen J, Huang X, Liao C. Subclinical impairment of ovarian reserve in systemic lupus erythematosus patients with normal menstruation not using alkylating therapy. *J Womens Health (Larchmt)*. 2013 Dec;22(12):1023-7.
16. Velarde-Ochoa MD, Esquivel-Valerio JA, Vega-Morales D, Skinner-Taylor CM, Galarza-Delgado DA, Garza-Elizondo MA. Anti-Müllerian hormone in reproductive age women with systemic lupus erythematosus. *Reumatol Clin*. 2014;May 8. pii: S1699-258X(14)00085-0.
17. Chen D, Yuan S, Zhan Z, Zhan Y, Yang X, Liang L. Assessment of ovarian reserve with anti-Müllerian hormone in female patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2014;94(13):977-80.
18. de Araujo D, Yamakami L, Aikawa N, Bonfá E, Viana V, Pasoto S, et al. Ovarian reserve in adult patients with childhood-onset lupus: a possible deleterious effect of methotrexate? *Scand J Rheumatol*. 2014;Jun 2:1-9.
19. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-1277.

20. Hochberg MC (1997). Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997;40(9):1725.
21. Bombardier C, Gladman DD, Urowitz MB, Caron D, Chang CH. Derivation of the SLEDAI. A disease activity index for lupus patients. The Committee on Prognosis Studies in SLE. *Arthritis Rheum.* 1992;35(6):630-40.
22. Gladman D, Ginzler E, Goldsmith C, Fortin P, Liang M, Urowitz M, et al. The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996;39(3):363-9.
23. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Ver.* 1997;18:107-34.
24. Bleil ME, Gregorich SE, Adler NE, Sternfeld B, Rosen MP, Cedars MI. Race/ethnic disparities in reproductive age: an examination of ovarian reserve estimates across four race/ethnic groups of healthy, regularly cycling women. *Fertil Steril.* 2014 Jan;101(1):199-207.
25. Schuh-Huerta SM, Johnson NA, Rosen MP, Sternfeld B, Cedars MI, Reijo Pera RA. Genetic markers of ovarian follicle number and menopause in women of multiple ethnicities. *Hum Genet.* 2012 Nov;131(11):1709-24.
26. Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Araújo ARB, Gitai DLGG, da Silva A, et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. *Plos One.* 2013 Sep;8(9):e75145.
27. Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC, Strauss JF 3rd. Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril.* 2007;87:101-6.
28. Steiner AZ, Stanczyk FZ, Patel S, Edelman A. Antimullerian hormone and obesity: insights in oral contraceptive users. *Contraception.* 2010;81:245-8.
29. Halawaty S, ElKattan E, Azab H, ElGhamry N, Al-Inany H. Effect of obesity on parameters of ovarian reserve in premenopausal women. *J Obstet Gynaecol Can.* 2010;32:687-90.
30. Overbeek A, Broekmans FJ, Hehenkamp WJ, Wijdeveld ME, van Disseldorp J, van Dulmen-den Broeder E, et al. Intra-cycle fluctuations of anti-Mullerian hormone in normal women with a regular cycle: a re-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012;24:664-9.
31. La Marca A, Papaleo E, Grisendi V, Argento C, Giulini S, Volpe A. Development of a nomogram based on markers of ovarian reserve for the individualisation of the follicle-stimulating hormone starting dose in in vitro fertilization cycles. *BJOG.* 2012;119:1171-9.
32. Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ. The impact of smoking on antimullerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause* 2010;17:571-6.
33. Fréour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, et al. Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Arch Gynecol Obstet.* 2012;285:1177-82.
34. Nardo LG, Christodoulou D, Gould D, Roberts SA, Fitzgerald CT, Laing I. Anti-Mullerian hormone levels and antral follicle count in women enrolled in in vitro fertilization cycles: relationship to lifestyle factors, chronological age and reproductive history. *Gynecol Endocrinol.* 2007;23:486-93.
35. Dafopoulos A, Dafopoulos K, Georgoulas P, Galazios G, Limberis V, Tsikouras P, et al. Smoking and AMH levels in women with normal reproductive history. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;282:215-9.
36. Waylen AL, Jones GL, Ledger WL. Effect of cigarette smoking upon reproductive hormones in women of reproductive age: a retrospective analysis. *Reprod Biomed Online.* 2010;20:861-5.
37. Bartels EM, Ribel-Madsen S. Cytokine measurements and possible interference from heterophilic antibodies--problems and solutions experienced with rheumatoid factor. *Methods.* 2013;61(1):18-22.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação de mestrado é fruto do trabalho realizado no ambulatório de lúpus eritematoso sistêmico do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A colaboração de professores, médicos contratados, médicos residentes e alunos de iniciação científica foi fundamental para a realização deste estudo.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

1. **Eritema malar:** eritema fixo, plano ou elevado, nas eminências malares, tendendo a poupar a região nasolabial.
2. **Eritema discoide:** placas eritematosas elevadas, ocorrendo cicatrização atrófica nas lesões antigas.
3. **Fotossensibilidade:** eritema cutâneo resultante de reação incomum ao sol, por história do paciente ou observação do médico.
4. **Úlcera oral:** ulceração oral ou nasofaríngea, geralmente não-dolorosa, observada pelo médico.
5. **Artrite:** artrite não erosiva envolvendo 2 ou mais articulações periféricas, caracterizada por dor à palpação, edema ou derrame.
6. **Serosite:**
 - (a) pleurite – história convincente de dor pleurítica, atrito auscultado pelo médico ou evidência de derrame pleural.
ou
 - (b) pericardite – documentada por ECG, atrito ou evidência de derrame pericárdico.
7. **Alteração renal:**
 - (a) proteinúria persistente >0,5g por dia ou >3+ se não quantificada
ou
 - (b) cilindros celulares: podem ser hemáticos, granulares, tubulares ou mistos.
8. **Alteração neurológica:**
 - (a) convulsão – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

ou

(b) psicose – na ausência de drogas implicadas ou alterações metabólicas conhecidas (ex.: uremia, cetoacidose ou distúrbios hidroeletrólíticos).

9. Alteração hematológica:

(a) anemia hemolítica com reticulocitose.

ou

(b) leucopenia - $<4000/\text{mm}^3$ total em 2 ou mais ocasiões.

ou

(c) linfopenia - $<1500/\text{mm}^3$ em 2 ou mais ocasiões.

ou

(d) trombocitopenia - $<100\ 000/\text{mm}^3$ na ausência de drogas causadoras.

10. Alteração imunológica:

(a) anti-dsDNA – anticorpo ao DNA nativo em títulos anormais.

ou

(b) anti-Sm – presença do anticorpo ao antígeno nuclear Sm.

ou

(c) achados positivos de anticorpos antifosfolípídeos baseados em: (1) concentração sérica anormal de anticardiolipina IgG ou IgM; (2) teste positivo para anticoagulante lúpico usando teste-padrão ou (3) VDRL falso positivo por pelo menos 6 meses e confirmado por FTA-Abs.

11. Anticorpo anti-nuclear (FAN): título anormal do FAN por imunofluorescência ou método equivalente em qualquer momento, na ausência de drogas sabidamente associadas ao lúpus induzido por drogas.

Para fins de classificação de doença, o (a) paciente deve apresentar pelo menos 4 dos 11 critérios.

7.2 ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA CONTROLES

AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS PORTADORAS DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que acomete principalmente mulheres em idade fértil e pode atuar negativamente sobre a fertilidade, sendo pela atividade da doença (que pode causar inflamação nos ovários) ou pela toxicidade das medicações utilizadas no seu tratamento. Este estudo está sendo realizado para avaliar o impacto desta doença na reserva ovariana destas pacientes, ou seja, na sua fertilidade/capacidade de engravidar.

DE QUE CONSTA O ESTUDO?

Serão utilizadas amostras de sangue de controles hígidos (pessoas sem doenças) e de pacientes com Lúpus eritematoso sistêmico. Serão dosados os níveis do hormônio anti-Mülleriano nestas amostras e comparados os seus valores. Através da dosagem do hormônio anti-Mülleriano podemos estimar a reserva ovariana, sendo que quanto mais altos os níveis deste hormônio, maior o número de folículos ovarianos remanescentes e maior a chance da mulher engravidar. Você que participará deste estudo e **NÃO** apresenta Lúpus, fará parte do grupo controle. Será feita comparação dos níveis de hormônio anti-Mülleriano das pacientes lúpicas com o grupo controle para investigar se há diferenças entre os dois grupos.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS DE PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

1. Colaborar para o avanço e progresso do conhecimento sobre o LES.

QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS DA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO?

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar punção venosa para coleta de sangue, que pode causar dor temporária e coleção de sangue na pele (equimose ou hematoma).

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PARTICIPANTE

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os participantes em hipótese alguma.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada participante é livre para decidir não participar.
- C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos participantes no Ambulatório, na Emergência nem na Internação do Hospital de Clínicas.
- D. O participante é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

- O participante não terá qualquer custo com a realização do exame.
- O participante receberá uma via deste documento.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, permito que os dados desta pesquisa sejam utilizados para avaliação de reserva ovariana através da dosagem do hormônio anti-Mülleriano.

Em caso de dúvida, você poderá contatar:

Pesquisador responsável: João Carlos Tavares Brenol.

Outros pesquisadores envolvidos no estudo: Andrese Aline Gasparin, Odirlei André Monticelo, Ricardo Machado Xavier, Claiton Viegas Brenol, Rafael Mendonça da Silva Chakr, Charles Lubianca Kohem, Penélope Palominos.

Serviço de Reumatologia: Telefone: (051) 3359 8340; FAX: (051) 3331 3834

Comitê de Pesquisa e Ética: Telefone: (051) 3359 8304

Paciente: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

7.3 Anexo III

TERMO DE RECONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS

Eu, _____ participante do estudo dos polimorfismos do receptor de vitamina D em pacientes com Lúpus Eritematoso sistêmico, realizado em 2011, consinto que a amostra sanguínea previamente coletada para este estudo seja utilizada para a realização de um novo estudo: **AVALIAÇÃO DA RESERVA OVARIANA EM MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS PORTADORAS DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**. O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença autoimune que acomete principalmente mulheres em idade fértil e pode atuar negativamente sobre a fertilidade, sendo pela atividade da doença (que pode causar inflamação nos ovários) ou pela toxicidade das medicações utilizadas no seu tratamento. Este novo estudo está sendo realizado para avaliar o impacto desta doença na reserva ovariana destas pacientes, ou seja, na sua fertilidade/capacidade de engravidar.

Através da dosagem do hormônio anti-Mülleriano podemos estimar a reserva ovariana, sendo que quanto mais altos os níveis deste hormônio, maior o número de folículos ovarianos remanescentes e maior a chance da mulher engravidar. Será feita comparação dos níveis de hormônio anti-Mülleriano das pacientes lúpicas com o grupo controle (pessoas sem lúpus) para investigar se há diferenças entre os dois grupos.

- O participante não terá qualquer custo com a realização do exame.
- O participante receberá uma via deste documento.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, permito que os dados desta pesquisa sejam utilizados para avaliação de reserva ovariana através da dosagem do Hormônio Anti-Mülleriano.

Em caso de dúvida, você poderá contatar:

Pesquisador responsável: João Carlos Tavares Brenol

Outros pesquisadores envolvidos no estudo: Andrese Aline Gasparin, Odirlei André Monticielo, Ricardo Machado Xavier, Claiton Viegas Brenol, Rafael Mendonça da Silva Chakr, Charles Lubianca Kohem, Penélope Palominos.

Serviço de Reumatologia Telefone: (051) 3359 8340; FAX: (051) 3331 3834

Comitê de Pesquisa e Ética: Telefone: (051) 3359 8304

Paciente: _____

Assinatura: _____

Pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Porto Alegre, ____ de _____ de 201__.

7.4 ANEXO IV

FICHA DE COLETA DE DADOS DOS INDIVÍDUOS CONTROLES

Nº:

Data da coleta:

Nome:

Data de nascimento:

Raça:

Sexo:

Comorbidades:

- DCV: () Assintomática () Angina () IAM () AVC () TVP () Trombose arterial
() TEP () Claudicação () AIT

- HAS:

- DM:

- Dislipidemia:

- Obesidade: IMC: Peso:____ Kg Altura:____ cm

Historia Familiar de LES: () Sim () Não () Desconhece

História familiar de DCV: () Sim () Não () Desconhece

Uso de medicações:

AAS () Estatinas() Anticoagulantes() Bifosfonados()
CaCO3+ Vit D() Anti-HAS()

Tabagismo: Extabagista: Anos/maço:

Etilista:

Uso de anticoncepcional oral: ()sim () não

Gestações:

Partos e Cesáreas:

Abortos

7.5 Anexo V

**PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DO AMBULATÓRIO
DE LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO**

IDENTIFICAÇÃO n° _____
 Nome: _____ Registro _____
 Sexo: F M Raça: Branco Não branco
 Data de nascimento: __/__/__
 Profissão: _____ Estado civil: _____
 Naturalidade/procedência: _____
 Endereço: _____
 Cidade: _____ CEP: _____ - _____
 Telefones: _____

Data do início dos sintomas: __/__/__ Data do diagnóstico: __/__/__
 Manifestações iniciais no diagnóstico: _____
 Início do acompanhamento no HCPA: __/__/__
 Óbitos: S N Data: __/__/__
 Causa: _____

CRITÉRIOS DE CLASSIFICAÇÃO PARA LES (ACR 1997)

1. Rash malar 2. Rash discoide 3. Fotossensibilidade 4. Úlceras orais/nasais
 5. Artrite 6. Serosite: Pleurite Pericardite
 7. Doença renal: Classe: _____ (data: __/__/__) sem biópsia
 Índice de atividade: ____/____ Índice de cronicidade: ____/____
 8. Doença neurológica: Psicose Convulsão
 9. Hematológico: Anemia hemolítica Leucopenia/linfopenia Plaquetopenia
 10. FAN: Titulação: _____ Padrão: _____
 11. Imunológico: anti-DNA (titulação _____) anti-SM
 aCL: IgG _____ IgM _____
 Anticoagulante lúpico VDRL

ALTERAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS ASSOCIADAS

Hipertensão	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Tabagismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> Atual <input type="checkbox"/> Passado
Diabetes	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Etilismo	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Anos-maço: <input type="checkbox"/> Atual <input type="checkbox"/> Passado
Dislipidemia	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Obesidade	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Peso: Altura: IMC:
Hist. Fam. DCV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	SAAF	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios folha anexa
Hist. Fam LES	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	S. de Sjögren	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	Assinalar critérios folha anexa
Eventos CV	<input type="checkbox"/> S	<input type="checkbox"/> N	<input type="checkbox"/> AVC	<input type="checkbox"/> AIT	<input type="checkbox"/> Angina	<input type="checkbox"/> IAM
			<input type="checkbox"/> Claudicação intermitente			<input type="checkbox"/> TVP
						<input type="checkbox"/> Outros

História obstétrica: G: ____ / P: ____ / C: ____ / A: ____ obs: _____

DAIs/Sobreposições: _____

Anti-ENA: _____

TRATAMENTO REALIZADO

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Corticoterapia (Dose Max: ____ mg/Kg/d) | <input type="checkbox"/> Pulsoterapia |
| <input type="checkbox"/> Azatioprina | <input type="checkbox"/> Cloroquina/hidroxicloroquina |
| <input type="checkbox"/> Micofenolato mofetila | <input type="checkbox"/> Dapsona |
| <input type="checkbox"/> Rituximabe | <input type="checkbox"/> AAS |
| <input type="checkbox"/> ACO/TRH | <input type="checkbox"/> CaCo3/D3 |
| <input type="checkbox"/> Estatina | <input type="checkbox"/> Danazol |
| <input type="checkbox"/> Ciclofosfamida | <input type="checkbox"/> Anticoagulante |
| <input type="checkbox"/> Metotrexate | <input type="checkbox"/> Bisfosfonados |
| <input type="checkbox"/> Ciclosporina | <input type="checkbox"/> Anti-hipertensivos |

7.6 Anexo VI

**ARTIGO DE REVISÃO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA EM MAIO/2014 - BJR-D-14-00041.**

RBBE-174; No. of Pages 5

ARTICLE IN PRESS

rev bras reumatol. 2015;xxx(xx):xxx-xxx



**REVISTA BRASILEIRA DE
REUMATOLOGIA**

www.reumatologia.com.br



Review article

**Anti-Müllerian hormone levels as a predictor of
ovarian reserve in systemic lupus erythematosus
patients: a review[¶]**

Andrese Aline Gasparin^{a,}, Rafael Mendonça da Silva Chakr^a, Claiton Viegas Brenol^b,
Penélope Ester Palominos^a, Ricardo Machado Xavier^b, Lucian Souza^c,
João Carlos Tavares Brenol^b, Odirlei André Monticielo^b*

^a Rheumatology Department, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Rheumatology Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

a r t i c l e i n f o

Article history:

Received 29 January 2014

Accepted 2 May 2014

Available online xxx

Keywords:

Anti-Müllerian hormone
Ovarian reserve
Systemic lupus erythematosus

a b s t r a c t

The anti-Müllerian hormone (AMH) is secreted from granulosa cells of growing ovarian follicles and appears to be the best endocrine marker capable of estimating ovarian reserve. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that predominantly affects women of reproductive age and may negatively affect their fertility due to disease activity and the treatments used. Recently, several studies assessed AMH levels to understand the real impact of SLE and its treatment on fertility.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

**Hormônio anti-Mülleriano como preditor de reserva ovariana em
pacientes lúpicas: uma revisão**

r e s u m o

O hormônio anti-Mülleriano (HAM) é secretado a partir das células da granulosa dos folículos ovarianos em crescimento e parece ser o melhor marcador endócrino capaz de estimar a reserva ovariana. O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune que acomete predominantemente mulheres em idade reprodutiva e pode afetar negativamente sua fertilidade pela atividade da doença, bem como pelos tratamentos usados. Conhecer o real impacto do LES e de seu tratamento na fertilidade vem sendo o objetivo de estudos recentes, os quais têm usado o HAM para esse fim.

© 2014 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

[¶] Department of Rheumatology of Hospital de Clínicas of Porto Alegre.

* Corresponding author.

E-mail: andresegasparin@gmail.com (A.A. Gasparin).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbre.2014.05.008>

2255-5021/© 2014 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Better treatment conditions and the management of infections have not only contributed to increase the survival of systemic lupus erythematosus (SLE) patients, but also provided better quality of life, so nowadays most of these patients are able to work normally. With the increasing participation of women in the labor market, the moment they decide to have their first child has been increasingly postponed. Female fertility starts to decline at the beginning of the third decade of life and could be hampered in SLE patients due to disease activity and its treatment. This makes fertility-related problems in such patients more and more important, hence the need to have effective markers to predict ovarian reserve.

Anti-Müllerian hormone as an ovarian reserve marker

Around the twentieth week of pregnancy, the number of oocytes reaches a maximum of six to seven million and, in a continuous process of atresia/apoptosis, only one to two million follicles reach the neonatal period.¹ Only oogonia that enter meiosis will survive atresia in the fetal ovary before birth. At menarche, around 300 thousand are viable. Women use around 500 primordial follicles during the reproductive years. At menopause, the ovary is formed by dense stroma and rare remaining scattered oocytes.²

Follicular growth starts in the fetus, in a continuous pattern, and is related to the total mass of follicles and with factors released by atretic ovarian follicles. Follicular growth cycles and subsequent atresia initiate before birth and continue through the reproductive years. The viability of the oocyte declines in older women in reproductive age before they present any measurable serum or intrafollicular hormone concentration decrease.³ Menopause is associated with a marked decline in the number of oocytes, which is attributed to the progressive atresia of the original *pool* of oocytes. However, evidences of complete depletion of oocytes are currently limited.³

The anti-Müllerian hormone (AMH), also called Müllerian-inhibiting substance, is a polypeptide, member of the transforming growth factor- β (TGF β) family. It is involved in the sexual differentiation of the male embryo, inducing regression of the Müllerian duct, embryological precursor of the female reproductive tract.⁴ In female individuals, it starts expressing in the fetal ovary after the 36th week of pregnancy. It is expressed by the granulosa cells of growing ovarian follicles: primary, secondary, preantral and small antral, being produced at higher levels by the last two.⁵ It has two main mechanisms of action in the ovary: inhibits the initial recruitment of primary follicles from primordial follicles, and inhibits the sensitivity of antral follicles to follicle-stimulating hormone (FSH) during cyclical recruitment (Fig. 1). The AMH prevents the premature depletion of follicles.⁶ Despite the "anti" prefix, the AMH has no role in the production of antibodies.

The term "ovarian reserve" describes the number and quality of the remaining oocytes in the ovaries. The amount of

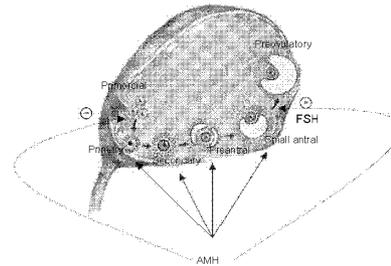


Fig. 1 – Anti-Müllerian hormone (AMH) and folliculogenesis. AMH is secreted by growing follicles and secretion increases over follicular development. Highest levels are secreted by preantral and small antral follicles. AMH inhibits the initial recruitment of primary follicles from the pool of primordial follicles and reduces the sensitivity of antral follicles to follicle-stimulating hormone (FSH) during recruitment.

remaining primordial follicles appears to correlate with the number of growing follicles. As only growing follicles produce AMH, their plasma levels reflect the amount of remaining primordial follicles.⁷ Studies in mice⁸ and chimpanzees⁹ have shown strong correlation between the levels of AMH and the number of primordial follicles.

Other current tests to estimate the ovarian reserve include hormone (FSH, estradiol, inhibin B) and sonographic markers (antral follicle count and measurement of ovarian volume). These tests direct or indirectly reflect the number of remaining antral follicles. Antral follicle count is a direct sonographic measurement. In the early follicular phase, the levels of inhibin B and estradiol are considered dependent on the number of antral follicles. FSH levels are regulated by negative feedback of these two granulosa cell products, so they indirectly reflect the *pool* of antral follicles. The age-related decline of oocytes leads to reduced levels of estradiol and inhibin B and, consequently, the increase of FSH.¹⁰ Compared with these hormonal markers, AMH plasma levels appear to associate better with the longitudinal decline of oocytes/follicles over time, even before the occurrence of irregular cycles.¹¹ As opposed to the cyclic fluctuations of FSH, estradiol and inhibin B, the AMH has small or absent intracyclic fluctuation. Therefore, the AMH reflects the continued growth of small follicles. AMH levels are relatively unaffected by conditions that suppress late stages of FSH-dependent follicular development, like pregnancy,¹² the use of hormonal contraceptives¹³ and the treatment with GnRH agonists. In addition to that, the AMH does not appear to be affected by the body mass index (BMI) or smoking.¹⁴ The predictive value of the AMH to estimate ovarian reserve is still uncertain. Several longitudinal prospective studies following normo-ovulatory women for more than 11 years have shown that the AMH is the best endocrine marker to assess ovarian aging, and that AMH plasma levels, with reasonable accuracy, can predict the onset of menopause.¹⁵

Table 1 – Summary of published articles.

Study	Design	Follow-up	Main results
Lawrenz et al. ²⁰	Case-control (33 patients in each group)	February 2009 to May 2010, Germany	SLE patients have significantly lower AMH levels than healthy controls.
Mok et al. ²⁹	Cohort study, 216 SLE patients	June to October, 2009, China	The mean AMH level was significantly lower in patients who had been previously exposed to cyclophosphamide.
Morel et al. ³⁰	Case-control (56 patients in each group)	2012, France	Low AMH levels in SLE patients, with significant decrease associated with age and prior use of cyclophosphamide.
Malheiro et al. ³¹	Case-control (27 patients in each group)	Brazil	The mean values of ovarian reserve were similar in both groups. SLE patients showed wider distribution of AMH values.

The AMH appears to be an early, reliable and direct predictor of declining ovarian function. However, there is no consensus regarding appropriate threshold values. Literature data showed significant dispersion of serum AMH concentrations in comparable populations obtained from two different ultrasensitive immunoassays available in the market – *AMH Beckman Coulter ELISA* and *AMH Diagnostic System laboratories (DSL) ELISA*. A previous study found AMH levels around 4.6 times lower with the DSL kit, showing that the cut-off value varies according to the assay being used.¹⁶ In studies that assessed the success rate of *in vitro* fertilization, serum AMH levels below 0.5 ng/mL strongly suggested follicular depletion, while serum levels ≥ 1.26 ng/mL were consistent with a good ovarian reserve.^{15,17}

How can lupus systemic erythematosus impair fertility?

Infertility is defined as the failure to conceive after 12 months of regular unprotected intercourse. Autoimmunity can interfere with many aspects associated with fertility, causing, for example, tubal function changes, ovarian failure, embryo implantation failure and miscarriages.

A case-control study conducted in 2009 in Finland assessed the reproductive history of SLE women compared with healthy controls. The authors found no difference in the mean age at menarche and the frequency of infertility. However, menopause occurred earlier among SLE patients.¹⁸

Around 10–30% of women with premature ovarian failure (POF) have a concomitant autoimmune disease.¹⁹ Autoimmune reactions against ovaries can be general or partial, leading to a fluctuating course of POF. The evidence of an autoimmune basis for POF is given by the presence of antibodies against steroid-producing cells in around 80% of patients and oophoritis with infiltration of CD4+ and CD8+ T lymphocytes.²⁰

It is suggested that fertility in some patients could be reduced due to menstrual irregularities and anovulatory cycles during disease activity and the administration of high doses of corticosteroids.²¹ At least 53% of SLE patients under the age of 40 present some degree of menstrual irregularity, while menstrual alterations are more frequent among patients with greater disease activity.²² The ovarian function can be reduced by autoimmune oophoritis in SLE, leading to POF, while a reduced ovarian reserve is associated with reduced AMH levels.²³ Lupus nephritis can result in end stage renal disease and amenorrhea together

with hyperprolactinemia.²⁴ Around one third of SLE women present antiphospholipid antibodies, which could explain the SLE/miscarriage association.²⁵

Therapeutic agents prescribed to treat SLE may impair fertility, such as is the case of high doses of steroids, NSAIDs and cyclophosphamide, which, in particular, influence the ovarian function, especially at older ages. A study published in 2006 found 39% of prevalence of ovarian failure among patients treated with cyclophosphamide under the age of 30 and 59% of patients aged 30–40.²⁶ A cohort study performed from September 2010 to July 2011 in the United States, comparing the reproductive history of young women with rheumatic diseases, with or without prior exposure to cyclophosphamide, concluded that more women with prior exposure to cyclophosphamide had amenorrhea, infertility and nulliparity.²⁷

Ovarian reserve assessment in premenopausal SLE patients through anti-Müllerian hormone – state-of-the-art

Few studies using AMH to assess ovarian reserve in SLE patients have been published to date. A case-control study conducted in Germany from February 2009 to May 2010 analyzed the influence of SLE in ovarian reserve considering disease activity and disease duration. The ovarian reserve was determined through serum AMH levels in 33 premenopausal SLE patients without prior exposure to cyclophosphamide and in 33 age-matched control patients. AMH levels in SLE patients were significantly lower than in healthy controls. No significant differences were found between the groups in relation to the number of children and abortions, and there was no correlation between the AMH level and the duration of the disease or SLEDAI as a disease activity index. Despite presenting mild disease activity, the ovarian reserve of SLE patients was significantly smaller than that of age-matched healthy controls.²⁸

AMH levels and its relationship with age and prior exposure to cyclophosphamide were investigated in a cohort of 216 Chinese SLE patients followed from July 2009 to October 2009. It was found that the mean level of AMH was significantly lower in patients who had prior exposure to cyclophosphamide, according to their ages. However, there was no significant differences when users or non-users of other immunosuppressive agents, such as mycophenolate mofetil, azathioprine and calcineurin inhibitors, were compared.²⁹

Please cite this article in press as: Gasparin AA, et al. Anti-Müllerian hormone levels as a predictor of ovarian reserve in systemic lupus erythematosus patients: a review. Rev Bras Reumatol. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.05.008>

A case-control study conducted in 2012 in France found low AMH levels in SLE patients with significant decrease associated with age and prior use of cyclophosphamide. Nevertheless, the risk of pregnancy failure was low (15.8%). The prior use of cyclophosphamide was a predictor while AMH levels were not.³⁰

A case-control study with a small number of patients (27 in each group) conducted in Brazil found similar mean ovarian reserve values in both groups. However, SLE patients showed broader distribution of AMH levels. The ovarian function was more compromised in patients with higher cumulative dose of cyclophosphamide and higher disease damage score.³¹ The summary of the main articles published to date can be seen in Table 1.

Conclusion

AMH has been increasingly reported as a reliable marker of ovarian reserve. The role of cyclophosphamide as the cause of infertility, evidenced by lower levels of AMH in age-matched and previously exposed patients, is well established. However, further studies, with larger number of patients, are necessary to assess differences in the ovarian reserve of SLE patients when compared with controls, and the implications of disease activity on the fertility of these patients. Agents with less ovarian toxicity could be offered to patients with reduced AMH levels and to those who wish to become pregnant.

Funding

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA), Brazil.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Peters H, Byskov AG, Grinsted J. Follicular growth in fetal and prepubertal ovaries in humans and other primates. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;7:469-85.
- Freitas, Menke, Rivoir, Passos. *Rotinas em ginecologia*. 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2011.
- Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;65:1231-7.
- Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev.* 1993;14:152-64.
- La Marca A, Stabile G, Arsenio AC, Volpe A. Serum anti-Müllerian hormone throughout the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 2006;21:3103-7.
- Visser JA, De Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction.* 2006;131:1-9.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992;7:1342-6.
- Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, Van de Lang-Born EM, De Jong FH, Groome NP, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology.* 2006;147:3228-34.
- Appt SE, Clarkson TB, Chen H, Adams MR, Christian PJ, Hoyer PB, et al. Serum anti-Müllerian hormone predicts ovarian reserve in a monkey model. *Menopause.* 2009;16:597-601.
- Burger HG, Cahir N, Robertson DM. Serum inhibins A and B fall differentially as FSH rises in perimenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48:809-13.
- De Vet A, Laven JS, De Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Anti-Müllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002;77:357-62.
- La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A. Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod.* 2005;20:1569-72.
- Li HW, Wong CY, Yeung WS, Ho PC, Ng EH. Serum anti-Müllerian hormone level is not altered in women using hormonal contraceptives. *Contraception.* 2011;83:582-5.
- Shaw CM, Stanczyk FZ, Egleston BL, Kahle LL, Spittle SC, Godwin AK, et al. Serum anti-Müllerian hormone in healthy premenopausal women. *Fertil Steril.* 2011;95:2718-21.
- Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod.* 2006;12:685-718.
- Fréour T, Miralié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D. Measurement of serum anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter Elisa and DSL Elisa: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). *Clin Chim Acta.* 2007;375:162-4.
- Gnoth C, Schuring AN, Friol K, Tigges J, Mallmann P, Godehardt E. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod.* 2008;23:1359-65.
- Eklblom-Kullberg S, Kautiainen H, Alha P, Helve T, Leirisalo-Repo M, Julkunen H. Reproductive health in women with systemic lupus erythematosus compared to population controls. *Scand J Rheumatol.* 2009;38:375-80.
- Nelson LM. Clinical practice. primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009;360:606-14.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev.* 1997;18:107-34.
- Gayed M, Gordon C. Pregnancy and rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxf).* 2007;46:1634-40.
- Shabanova SS, Ananieva LP, Alekberova ZS, Guzov II. Ovarian function and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol.* 2008;26:436-41.
- Carp HA, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J Autoimmun.* 2012;38:J266-74.
- Gomez F, De la Cueva R, Wauters JP, Lemarchand-Beraud T. Endocrine abnormalities in patients undergoing long-term hemodialysis. The role of prolactin. *Am J Med.* 1980;68:522-30.
- Bizarro N, Tonutti E, Villalta D, Tampoa M, Tozzoli R. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus erythematosus and women with unexplained recurrent miscarriages. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129:61-8.
- Manger K, Wildt L, Kalden JR, Manger B. Prevention of gonadal toxicity and preservation of gonadal function and fertility in young women with systemic lupus erythematosus treated by cyclophosphamide: the Prego study. *Autoimmun Rev.* 2006;5:269-72.
- Harward LE, Mitchell K, Pieper C, Copland S, Criscione-Schreiber LG, Clowse MEB. The impact of cyclophosphamide on menstruation and pregnancy in women with rheumatologic disease. *Lupus.* 2013;22:81-6.
- Lawrenz JC, Henes M, Henes E, Neunhoffer M, Schmalzing T, Fehm, et al. Impact of systemic lupus erythematosus on

Please cite this article in press as: Gasparin AA, et al. Anti-Müllerian hormone levels as a predictor of ovarian reserve in systemic lupus erythematosus patients: a review. *Rev Bras Reumatol.* 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.05.008>

- ovarian reserve in premenopausal women: evaluation by using anti-Müllerian hormone. *Lupus*. 2011;20:1193-7.
29. Mok CC, Chan PT, To CH. Anti-Müllerian hormone and ovarian reserve in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2013;65:206-10.
30. Morel N, Bachelot A, Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Galicier L. Study of anti-Müllerian hormone and the relationship with subsequent probability of pregnancy in 112 systemic lupus erythematosus patients exposed or not to cyclophosphamide. *The 10th International Congress on SLE. Lupus*. 2013;22:16.
31. Malheiro OB, Rezende CP, Ferreira GA, Reis FM, Federal University of Minas Gerais, Brazil. Ovarian reserve markers in reproductive age women with systemic lupus erythematosus. *The 10th International Congress on SLE. Lupus*. 2013;22:162.